

Das Alportsyndrom
-
proteomicsbasierte Suche nach Biomarkern im Serum

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Michael Pohl
geboren am 25.11.1972 in Berlin**

Gutachter:

1. Frau PD Dr. med. habil. Heidrun Rhode/Jena
2. Herr Prof. Dr. med. habil. Joachim Misselwitz/Jena
3. Herr PD Dr. med. habil. Ludwig Patzer/Halle (Saale)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2008

Übersicht verwendeter Abkürzungen:

1-D: 1. Dimension

2-D: 2. Dimension

3-D: 3. Dimension

A1: Alportproband 1

A2: Alportproband 2

A3: Alportproband 3

A4: Alportproband 4

A5: Alportproband 5

AATF: apoptosis antagonizing transcription factor

ACE: angiotensin converting enzyme

ADAM 8: a disintegrin and metalloproteinase domain 8

ADMA: asymmetrisches dimethyliertes Arginin

AS: Alportsyndrom

C: Konzentration

BSA: bovines Serumalbumin

C1: gesunder Kontrollproband 1

C2: gesunder Kontrollproband 2

C3: gesunder Kontrollproband 3

CrP: C-reaktives Protein

CTGF: connective tissue growth factor

Da: Dalton

DDAH: Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase

DEAE-Zellulose: Diethylaminoethyl-Zellulose

denatur.: denaturiert

EBM: epidermale Basalmembran

ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay

GBM: glomeruläre Basalmembran

GFR: glomeruläre Filtrationsrate

HLA: human leucocyte antigen

HPLC: high performance liquid chromatography

IL: Interleukin

J.: Jahre

LC-ESI-MS/MS: Liquid chromatography electro spray ionization mass-spectrometry/mass-spectrometry

LDL: low density lipoprotein

MALDI-TOF-MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

min.: Minute

MMP: Matrixmetalloproteinase

Mon.: Monate

MRD: Mark-Rinden-Differenzierung

mRNA: messenger Ribonukleinsäure

MS: Massenspektrometrie

NHS: normierte Höhensumme

NMMHC-IIa: nonmuskuläres Myosin IIa oder Myosin 9

NMMHC-IIc: nonmuskuläres Myosin IIc oder Myosin 14

NOS: Stickstoffmonoxidsynthetase

NW: Normwert

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

P: Perzentile

PRMT: Protein-Arginin-N-Methyltransferase

RP: reverse phase

TGF- β : transforming growth factor β

vol. %: Volumenprozent

vs.: versus

1.	Zusammenfassung	S. 7
2.	Einleitung	S. 9
2.1	Einführung	S. 9
2.2	Klinik	S. 9
2.3	Genetische Grundlagen und Pathogenese	S. 10
2.4	Diagnostik	S. 11
2.5	Therapeutische Optionen	S. 13
3.	Ziel der Arbeit	S. 15
4.	Methodik	S. 15
4.1	Einleitung	S. 15
4.2	Charakterisierung der Probanden	S. 18
4.2.1	Gesundes Vergleichskollektiv	S. 18
4.2.2.	Alportpatienten	S. 19
4.3	Material	S. 21
4.3.1	Blutentnahme	S. 21
4.3.2	Zweidimensionale Trennung	S. 21
4.3.3	Tryptischer Verdau	S. 21
4.3.4	LC-ESI-MS/MS	S. 22
4.3.5	MALDI–TOF-MS	S. 22
4.3.6	Software und Datenbanken	S. 22
4.4	Methoden	S. 22
4.4.1	Probengewinnung	S. 22
4.4.2	Zweidimensionale Trennung	S. 23
4.4.3	Messung der Proteinkonzentration	S. 25
4.4.4	Tryptischer Verdau	S. 25
4.4.5	Selektion von Fraktionen	S. 26
4.4.6	MALDI–MS/Matrix	S. 28
4.4.7	LC-ESI-MS/MS	S. 28
4.4.8	MALDI–TOF-MS	S. 30
4.4.9	In-silico-Verdau, verwendete Datenbank und Software	S. 30
4.4.10	Kriterien der Auswahl der potentiellen Markerkandidaten	S. 32

5.	Ergebnisse und Diskussion	S. 33
5.1	Datengewinnung	S. 33
5.2	Auswertung Patienten A1-A2-A3 vs. Kontrolle C1	S. 37
5.3	Auswertung Patient A4 vs. Kontrolle C2	S. 39
5.4	Auswertung Patient A5 vs. Kontrolle C3	S. 43
5.5	Bekannte Serumproteinveränderungen	S. 45
5.5.1	Bekannte Veränderungen der Serumproteinzusammensetzung	S. 45
5.5.2	Wahrscheinlicher Proteinverlust durch Filtration	S. 48
5.6	Potentielle Biomarker-Kandidaten	S. 49
5.6.1	Potentielle Marker aus der Inflammation/Akut-Phase-Reaktion	S. 50
5.6.2	Potentielle ätiopathogenetische Marker	S. 52
5.6.3	Potentielle Matrix-Umbau-Marker	S. 66
5.6.4	Potentielle Apoptose-Marker	S. 67
5.6.5	Weitere potentielle Marker	S. 68
6.	Schlussfolgerung	S. 72
7.	Literaturverzeichnis	S. 74
8.	Anhang	S. 83

1. Zusammenfassung

Das Alportsyndrom (AS) ist eine hereditäre Erkrankung, die mit einer Schädigung der Niere, des Innenohres und des Auges einhergeht. Die Prävalenz wird auf 1:5000 bis 1:10000 geschätzt. Die renale Beteiligung ist mit der Folge der Progredienz zur terminalen Niereninsuffizienz die entscheidende Größe. Genetische Grundlage des AS sind Mutationen in den Genen, die das Kollagen Typ IV kodieren. Man unterscheidet die X-chromosomale Form (80 %), die autosomal rezessive (ca. 15 %) und die autosomal dominante Form (ca. 5 %). Daraus folgen Veränderungen in der Kollagenkomposition der renalen Basalmembranen, die in der Integrität gestört ist. Jedoch sind auch andere Basalmembranen betroffen. Lange Zeit war eine kommerzielle genetische Analyse nicht möglich. Noch immer ist sie sehr teuer. Deswegen stellt die nicht risikofreie Nierenbiopsie ein wichtiges Diagnostikum dar. Therapieoptionen sind beispielsweise ACE-Hemmer und Statine, bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz Dialyseverfahren und Nierentransplantation.

Mit der proteomicsbasierten Methode sollten Proteine oder Peptide des Serums als Markerkandidaten identifiziert werden, die das Potential haben, in der frühzeitigen und wenig invasiven Diagnostik des AS eingesetzt zu werden. Weiterhin sollten die potentiellen Marker Hinweise auf die Pathogenese des AS ergeben, und so zu besseren therapeutischen Interventionen verhelfen.

Serumproteome von 5 Alportpatienten und 3 Kontrollprobanden wurden paarweise mittels zweidimensionaler Chromatographie fraktioniert und verglichen. Von den erhaltenen Fraktionen wurden diejenigen weiter analysiert, die signifikante Unterschiede zwischen der Proteinkonzentration der Patienten und der Kontrollprobe aufwiesen. Dabei wurden die Proteine und Peptide in diesen Fraktionen mittels eines massenspektrometrischen Verfahrens (LC-ESI-MS/MS) identifiziert und mittels eines anderen (MALDI-MS) quantifiziert. Standardverfahren der Albuminbestimmung und der Urineiweißanalyse gaben Hinweise für die Validität der Methode.

Es konnten potentielle Marker isoliert werden, die sich in die Pathogenese des AS einordnen ließen. Als Beispiele sind Myosin 9, gerade in Zusammenhang mit dem Myosin 14, das Kollagen alpha2(IV), die ADAM 8 und das Protein NCK-2 zu nennen.

Keiner der potentiellen Marker ließ sich jedoch über alle Patienten hinweg mit einem Abfall oder mit einem Anstieg der verwendeten Quantifikatoren, normierte Höhensummen und Founds, nachweisen. Die Gründe hierfür können in physiologisch bestehenden interindividuellen oder stadienabhängigen Unterschieden bei den Probanden oder in methodischen Limitationen zu finden sein.

Dementsprechend müssen die potentiellen Marker mit einer anderen Methode und anhand eines größeren Kollektivs verifiziert werden. Weiterhin müssen die potentiellen Markerkandidaten auf ihre Spezifität beim AS geprüft werden. Es bleibt zu vermuten, dass nicht ein Marker allein für die Diagnose des AS in Betracht kommt, sondern dass am ehesten eine Kombination mehrerer Proteine oder Peptide die Diagnose ermöglichen könnte oder aber auch den Krankheitsfortschritt dokumentiert. Betrachtet man den sehr aufwendigen Analysevorgang, so erscheint die Methode zur Vorauswahl potentieller Marker an geringen Fallzahlen geeignet.

2. Einleitung

2.1 Einführung

Das AS ist eine hereditäre Erkrankung, die mit einer Schädigung der Niere, des Innenohres und des Auges einhergeht. Erstmals wurde sie 1927 von A. Cecil Alport anhand einer Familie beschrieben, bei der die Kombination Nephritis und Schwerhörigkeit bestand. Schon Alport bemerkte den schwerwiegenderen Verlauf mit früherem Tod bei den männlichen Betroffenen verglichen mit den weiblichen Familienmitgliedern (Alport 1927). Die Prävalenz der X-chromosomalen Variante wird auf 1:5000, die der autosomal vererbten Variante auf 1:50000 geschätzt (Gross und Weber 2005).

2.2 Klinik

Beim AS findet die Nephropathie in einer Erythrocyturie anfangs ohne, später mit Proteinurie ihren Ausdruck. Die renale Beteiligung ist mit der Folge der Progredienz zur terminalen Niereninsuffizienz die entscheidende Größe. Je nach Art der ursächlichen Mutation erreichen die Patienten der am häufigsten vorkommenden X-chromosomalen Variante die terminale chronische Niereninsuffizienz vor dem zwanzigsten aber auch deutlich nach dem dreißigsten Lebensjahr (Jais et al. 2000, Gross et al. 2002). Bei den heterozygoten weiblichen Individuen entwickeln ca. 15 % eine terminale Niereninsuffizienz bis zum Alter von 50 Jahren (Kashtan 2004).

Zur Diagnose führen folgende Kriterien (Flinter et al. 1988):

- positive Familienanamnese in Bezug auf Hämaturie mit oder ohne Niereninsuffizienz
- ultrastrukturelle Veränderungen der glomerulären Basalmembran (GBM)
- progrediente Innenohrschwerhörigkeit
- charakteristische Augenveränderungen i. S. eines Lenticonus oder einer Makulopathie

Es sollen drei Kriterien erfüllt sein. Es bleibt jedoch zu betonen, dass andere Autoren (Pajari et al. 1996, Gubler et al. 1999, Jais et al. 2000) weniger strikte oder auch

erweiterte Kriterien verwenden. Es muss bei jedem Kind mit Mikro- oder Makrohämaturie, auch ohne entsprechende Familienanamnese, ein AS in die differentialdiagnostischen Erwägungen einbezogen werden.

Der Literatur nach wird eine progrediente Schwerhörigkeit, die den Frequenzbereich 2000–8000 Herz betrifft, bei 55–75 % der männlichen und ca. 20 % der weiblichen Patienten nachgewiesen (Flinter et al. 1988, Pajari et al. 1996). Diagnostiziert wird sie mit durchschnittlich 12 Jahren. Oftmals ist sie jedoch bis ins Erwachsenenalter nur audiometrisch erfassbar. Charakteristische Augenveränderungen wie Lenticonus anterior oder fleckförmige, gelbliche Retinaveränderungen finden sich nur bei 15–35 % der Patienten und betreffen fast ausschließlich das männliche Geschlecht (Schärer 2002).

2.3 Genetische Grundlagen und Pathogenese

Genetische Grundlage des AS sind Mutationen in den Genen, die für das Kollagen Typ IV kodieren. Die X-chromosomale Form betrifft das COL4A5-Gen mit der daraus folgenden alpha5-Kette. Sie ist für ca. 80 % der Fälle verantwortlich. Bei der autosomal rezessiven Form (ca. 15 % der Patienten) sind Mutationen wie bei der autosomal dominanten Form (ca. 5 %) (Kashtan 2005) im COL4A3- oder COL4A4-Gen ursächlich, die sich auf Chromosom 2 befinden. Genprodukte sind die alpha3- und alpha4-Ketten.

Allein über 300 Mutationen sind im COL4A5-Gen beschrieben. Einige Dutzend sind für COL4A3- und COL4A4-Gen bekannt (Kashtan 2004). Nur wenige dieser Mutationen sind in mehr als einer Familie nachgewiesen worden. Jedes dieser Gene umfasst ca. 50 Exons und ist damit sehr groß (Kashtan 2005).

Betrachtet man das X-chromosomale AS, so kann man (Gross et al. 2002) eine Phenotyp/Genotyp–Korrelation feststellen und die Patienten einteilen:

1. schwerer Phänotyp: terminale chronische Niereninsuffizienz mit ca. 20 Jahren, die ihre Ursache in vorzeitigen Stopcodons, „frameshift“-Mutationen, Mutationen in der NC-1 Domäne, „donor splice site“-Mutationen oder großen „rearrangements“ hat.
2. mittelgradig schwerer Phänotyp: die Betroffenen gelangen in der Mitte der dritten Lebensdekade in die terminale Niereninsuffizienz; die Mutationen sind „non–

- glycine-XY missense“-Mutationen, „in-frame“ und „acceptor splice site“-Mutationen und Glycin XY-Substitutionen in Exon 21-47.
3. moderater Phänotyp: die terminale chronische Niereninsuffizienz tritt oberhalb des 30. Lebensjahres ein. Als Ursache kommen Glycin-XY-Substitutionen in Exon 1-20 in Betracht.

Typ-IV-Kollagen ist Hauptbestandteil aller Gefäßbasalmembranen. Grundlage des Typ-IV-Kollagen-Netzwerkes ist ein aus jeweils drei der sechs α -Ketten bestehendes Molekül. Die α 1-/ α 2- und α 3-/ α 4-/ α 5-Netzwerke bestehen separat nebeneinander. Das α 3-/ α 4-/ α 5-Netzwerk der GBM wird durch Disulfidbrücken zusätzlich stabilisiert. Typ IV Kollagen besteht aus einem sehr langen Kollagenschwanz und einer nichtkollagenen NC1-Domäne. Die Tripelhelixstruktur wird dadurch ermöglicht, dass jede dritte Aminosäure Glycin ist (Gross und Weber 2005). Die einzigartige Tripelhelix-Struktur wird durch die Mutationen gestört. In der Folge zeigt die GBM einen mangelhaften Aufbau und eine mangelhafte Funktion. Ursache hierfür ist unter anderem der Einbau von α 1- und α 2-Ketten (Kalluri et al. 1997). Im Weiteren verweisen Gross und Weber (Gross und Weber 2005) auf einsetzende Fibroseprozesse, die über Kollagenrezeptoren der Podozyten und Endothelzellen vermittelt werden und zu einer Hochregulation von profibrotischen Faktoren wie TGF- β (transforming growth factor β), Metalloproteinasen, CTGF (connective tissue growth factor) und Chemokinen führen. Der Grund für die vermehrte Bildung fibrotischer Faktoren wird in Reparaturversuchen an der glomerulären Basalmembran gesehen, die jedoch frustan verlaufen und in der renalen Fibrose und Nephrosklerose und damit weiter alterierender renalener Funktion enden. Die okuläre und sensineurale Beteiligung ist durch Vorhandensein mutierter α 3-, α 4- und α 5-Ketten dort erklärbar.

2.4 Diagnostik

Die α 5-Kette des Typ IV Kollagen lässt sich in verschiedenen Geweben nachweisen. Wir finden sie in der distalen tubulären Basalmembran und der GBM der Niere, in der Bowmanschen Kapsel und in der epidermalen Basalmembran (EBM) (Kashtan 1999). Damit eröffnet sich eine diagnostische Möglichkeit - die Hautbiopsie. Hierbei nutzt man den Fakt, dass beim X-chromosomalen AS immunhistochemisch die α 5-Kette in der

EBM bei 80 % der homozygoten Patienten nicht nachgewiesen werden kann. Beim heterozygoten Patienten zeigt sich ein segmentales Färbemuster (Muda et al. 2003).

Von großer Bedeutung in der Diagnostik ist jedoch immer noch die Nierenbiopsie. Bei anfangs nur geringen Veränderungen in der Lichtmikroskopie und meist negativer Immunfluoreszenz in Bezug auf Komplementfaktoren und Immunglobuline, ist die Elektronenmikroskopie oftmals wegweisend. Die GBM ist in ihrer typischen trilaminären Struktur aufgehoben. Bei männlichen Individuen zeigt sich eine diffuse, zunehmende Verdickung der Lamina densa mit korbgeflechtartiger Vernetzung der GBM (Kashtan 1998). Hervorstechendes Merkmal ist im Weiteren das gleichzeitige Vorkommen von dünner und verdickter aufgesplitteter GBM, oft in derselben Kapillarschlinge. Bei Frauen und Kindern ist die GBM anfangs eher fokal verdünnt und geht mit fortschreitender Erkrankung in die schon beschriebenen Veränderungen über. Gerade bei fehlender Familienanamnese und fehlender Schwerhörigkeit ist die Biopsie für die Diagnostik immens wichtig (Schärer 2002).

Wichtige diagnostische Schritte liegen immer noch im bioptischen Bereich, da die Schwerhörigkeit oftmals erst im Alter von 12 Jahren diagnostiziert wird. Wie erwähnt begleitet dieses Symptom das AS nur in 55–75 % der Fälle. Weibliche Individuen sind noch seltener betroffen. Noch seltener sind die typischen Augenveränderungen (15–35 %). Es ist erstrebenswert, Patienten und ihren Eltern eine einfache Diagnostik zu bieten, beispielsweise einen Nachweis pathognomonischer Veränderungen im Bereich der Serum- oder Harnproteine, der dann bei einer Routineblut- oder Urinentnahme diagnostische Sicherheit böte. Um eine große Anzahl von Proteinen zu untersuchen, könnten Verfahren aus dem Bereich der Proteomics genutzt werden. Hierbei werden Proteine von Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten durch (mehrdimensionale) hochauflösende Verfahren, wie z.B. high pressure liquid chromatography oder 2-D-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und danach massenspektrometrisch identifiziert und ggf. sogar quantifiziert (Haubitz et al. 2004).

Eine seit relativ kurzer Zeit kommerziell angebotene Option stellt die genetische Diagnostik dar, die jedoch aufgrund der großen Zahl an Mutationen aufwändig und damit sehr teuer ist.

2.5 Therapeutische Optionen

Obwohl sich eine Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit zur Transplantation bisher nicht verhindern lässt, gibt es doch Hinweise, dass eine frühzeitige Therapie den zeitlichen Verlauf deutlich strecken kann.

Cyclosporin war eine therapeutische Möglichkeit. Es soll über Veränderungen der renalen Hämodynamik, über eine Veränderung der Filtrationseigenschaften der GBM, speziell der Ladung, und über immunologische Mechanismen wie Beeinflussung der Lymphokinbalance einen positiven Einfluss ausüben (Chen et al. 2003, Callis et al. 1999). Insgesamt scheint die Studienlage in Bezug auf den Einsatz von Cyclosporin wenig überzeugend (Chen et al. 2003, Callis et al. 1999, Callis et al. 1992, Charbit et al. 2007). Gerade deswegen sollte berücksichtigt werden, dass Cyclosporin an sich schon einen nephrotoxischen Effekt hat und weitere nicht unbedeutende Nebenwirkungen zeigt (Charbit et al. 2007).

Eine bessere therapeutische Option stellen ACE-Hemmer dar. Sie sollen über eine Verminderung der Proteinurie die nachfolgende renale Fibrose verlangsamen und den Zeitpunkt hinausschieben, an dem die terminale Niereninsuffizienz eintritt. Weiterhin greifen sie in den Bradykinin-, den Angiotensin- und den TGF- β -Metabolismus ein und wirken auch dadurch antifibrotisch (Gross et al. 2003). Im Hundemodell des X-chromosomalen AS zeigt sich der Benefit von ACE-Hemmern (Grodecki et al. 1997). Es gibt sehr deutliche Hinweise, dass eine frühzeitige Intervention mit ACE-Hemmern zu einer Verlangsamung der Progredienz des AS im Mausmodell führt (Gross et al. 2003). In einer kleineren Studie im Kindesalter scheint der Einsatz von ACE-Hemmern einen positiven Einfluss auf die Erkrankung zu haben (Proesmans et al. 2000, Proesmans und Van Dyck 2005). Ebenso gibt es im Erwachsenenalter Hinweise dafür (Cohen und Lemann 1996). Auch die Kombination aus ACE-Hemmer, Angiotensinrezeptorblocker und Spironolacton scheint im Jugendalter positive Effekte zu haben (Kaito et al. 2006). Eine Studie widerspricht jedoch dem positiven Einfluss des ACE-Hemmers in frühen Erkrankungsstadien (Adler et al. 2002). Im Vergleich zum Cyclosporin erscheint ein therapeutisches Vorgehen vor allem mit ACE-Hemmern trotz gegenwärtig sehr mäßiger

Datenlage doch eher vertretbar zu sein, da diese Medikamentenklasse im Vergleich zum Cyclosporin ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsspektrum zeigt.

Eine weitere, im Tiermodell viel versprechende Therapieoption, scheinen Statine zu sein. Unter Behandlung mit Cerivastatin kam es bei alpha3-knock-out-Mäusen zu einer deutlich langsameren Progression der chronischen Niereninsuffizienz. Diese fand ihre Ursache in der verminderten Progression der renalen Fibrose. Damit überlebten die Tiere länger. Der Wirkungsmechanismus ist letztendlich noch nicht geklärt, liegt aber nicht allein in der Minderung der durch die Nephrose verursachten Fettstoffwechselstörung (Koepke et al. 2007).

Weitere therapeutische Ansätze, wie Stammzell- oder Knochenmarktransplantation werden in letzter Zeit häufiger beschrieben, befinden sich jedoch im tierexperimentellen Stadium (Floege et al. 2006, Sugimoto et al. 2006, Prodromidi et al. 2006). Auch werden weitere medikamentöse Ansätze wie z. B. der Vasozeptidaseinhibitor AVE7688 oder der Chemokinrezeptorantagonist BX471 untersucht (Gross und Weber 2005).

Gegenwärtig stellt die Nierentransplantation und die meist vorangehende Dialyse die einzige verlässliche Therapieoption dar. Sie ist jedoch erst im Endstadium der Niereninsuffizienz indiziert. Eine seltene, jedoch schwerwiegende Komplikation nach Transplantation stellt die anti-GBM-Nephritis dar. Dabei sind die Antikörper gegen Epitope der Kollagenketten gerichtet, die im Rezipienten nicht vorhanden waren und erst durch das Transplantat eingeführt wurden (Kashtan 1999, Kashtan 2006).

Das potentielle therapeutische Vorgehen könnte nach frühzeitiger Diagnosestellung ebenfalls besser und standardisierter evaluiert werden. Daher ist eine frühe Diagnosemöglichkeit dringend erforderlich. Dabei sollten idealerweise die Risiken einer Biopsie umgangen werden. Aus einem frühzeitigen therapeutischen Ansatz auf der Grundlage einer frühen Diagnose ließe sich möglicherweise die terminale Niereninsuffizienz verzögern und dadurch ein deutliches Plus an Lebensqualität für die Patienten gewinnen.

3. Ziel der Arbeit

Mit proteomicsbasierten Methoden sollten Proteine oder Peptide des Serums als Markerkandidaten identifiziert werden, die das Potential haben, in der frühzeitigen und wenig invasiven Diagnostik des AS eingesetzt zu werden.

Mit dieser Methode sollte die Basis geschaffen werden, die Risiken der Nierenbiopsie zukünftig zu umgehen. Die zu suchenden potentiellen Marker sollten einfach bestimmbar sein, um eine kostengünstigere Diagnose zu ermöglichen, als sie bisher beispielsweise die genetische Analyse bietet. Weiterhin könnten potentielle Marker Hinweise auf die Pathogenese des AS ergeben und so zu besseren therapeutischen Interventionen verhelfen.

Dazu sollen die Serumproteome von Alportpatienten und Kontrollprobanden im Kindes- und Jugendalter paarweise mittels zweidimensionaler nichtdenaturierender Chromatographie fraktioniert (Horn et al. 2006, Kreusch et al. 2005) und verglichen werden. Von den erhaltenen Fraktionen werden diejenigen weiter analysiert, die signifikante Unterschiede zwischen der Proteinkonzentration der Patienten und der Kontrollprobe aufweisen. Die Proteine und Peptide in diesen Fraktionen werden mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert und mittels MALDI-TOF-MS quantifiziert.

Diejenigen Bestandteile der untersuchten Fraktionen, die sich reproduzierbar unterscheiden, werden als mögliche Markerkandidaten angesehen.

4. Methodik

4.1 Einleitung

Zur proteomicsbasierten Biomarkersuche im Serum bei AS wurde ein nichtdenaturierendes 2-dimensionales Trennverfahren (Horn et al. 2006) und ein massenspektrometrisches Quantifizierungsverfahren (Bublitz et al. 2006) eingesetzt. Dabei erfolgt die Suche nach potentiellen Biomarkern mittels einer mehrschrittigen Analyse der gewonnenen Daten.

Hierbei werden die Serumproben zuerst nach Molekulargewicht durch Größenausschlusschromatographie getrennt. Im Anschluss daran erfolgt nach Dialyse eine

Trennung nach Ladung durch eine Anionenaustauschchromatographie. Es entstehen so 2400 bzw. 3360 verschiedene Fraktionen. Hierbei werden die Serumproben eines Alportpatienten und eines gesunden Probanden paarweise aufgearbeitet. Danach wird die Proteinkonzentration in jeder Fraktion durch Absorbanzmessung bestimmt, um Fraktionen mit gravierenden Konzentrationsdifferenzen auszuwählen. Nach dem tryptischen Verdau der ausgewählten Fraktionen erfolgt eine Identifizierung der Proteine oder Peptide durch LC-ESI-MS/MS und eine Quantifizierung durch MALDI-TOF-MS. Prinzipiell sind weitere Trennverfahren wie Hydrophobizitäts- oder Affinitätschromatographie denkbar, die eine noch feinere Auftrennung des humanen Serumproteoms ermöglichen würden (Abbildung 1).

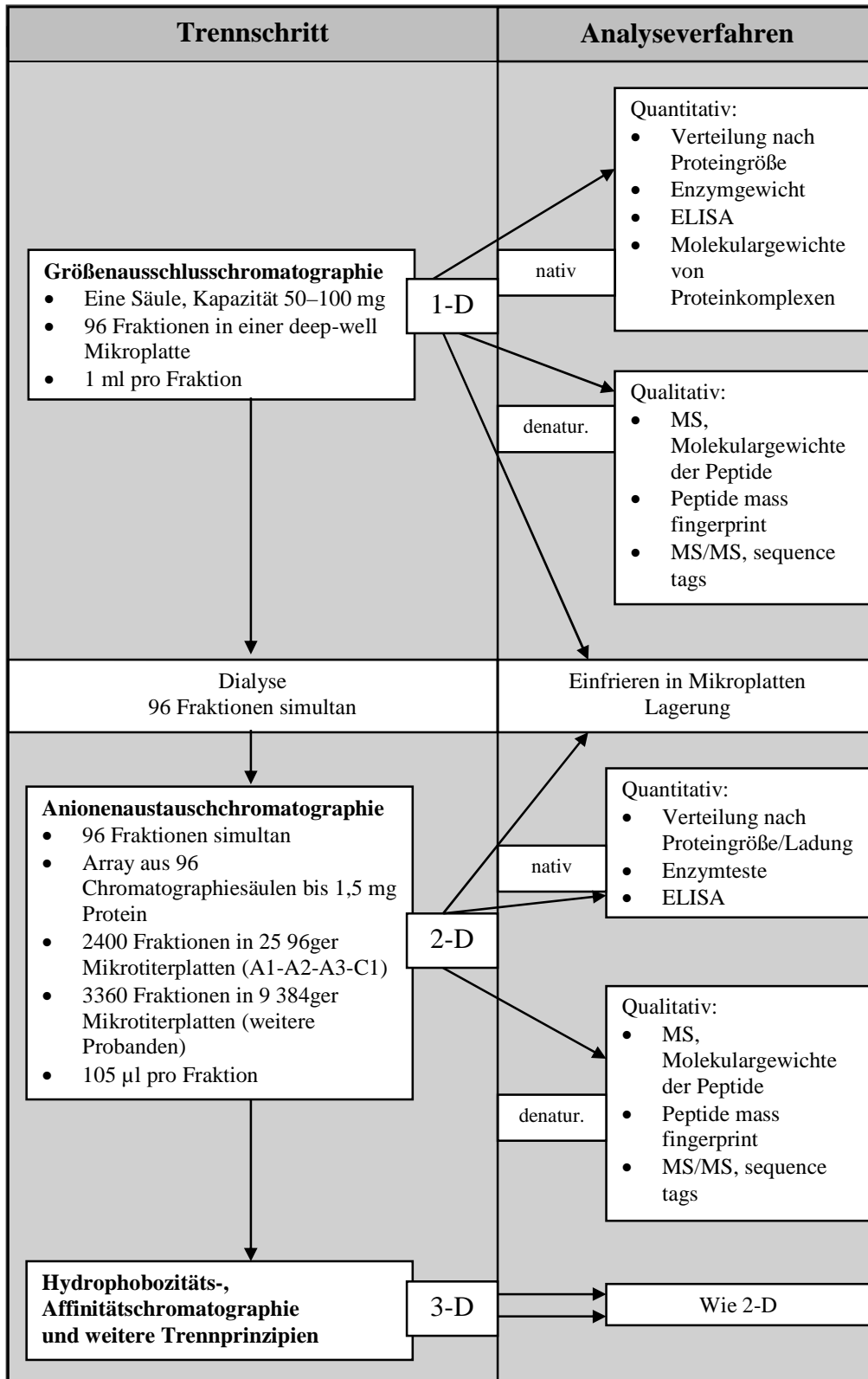


Abbildung 1: Flussschema des Trennverfahrens und der Analysemöglichkeiten

4.2 Charakterisierung der Probanden

Vier Patienten (drei männliche Patienten: 18/4 und 16/11 Jahre, eine Analyse mit Verlauf bei einem weiteren Patienten im Alter von 12/1 und 13/4 Jahren; ein weiblicher Patient: 9/1 Jahre) mit histologisch gesichertem AS wurden drei gesunde Probanden (zwei männliche Probanden: 11/8 und 21/11 Jahre, ein weiblicher Proband: 9/4 Jahre) zugeordnet. Diese Zuordnung erfolgte nach Alter und Geschlecht. Auch in der weiteren Versuchsreihe bei der Aufarbeitung der Serumproben wurde die Zuordnung gewahrt und die entsprechenden Paare parallel verarbeitet, um gleiche Untersuchungsbedingungen zu erzielen.

Für den Probanden A3 stand zum Untersuchungszeitpunkt kein vergleichbarer Proband zur Verfügung, deswegen wurden die Trennungen mit zeitlichem Abstand durchgeführt. Die Proben A1 und A2 stammen von einem Probanden, die Proben wurden im Abstand eines Jahres entnommen. Sie wurden mit demselben gesunden Probanden verglichen. Die Probenaufarbeitung wurde hier im Abstand von einem Jahr durchgeführt.

Die notwendige Blutentnahme wurde innerhalb einer an sich notwendigen Routine-Blutentnahme bei den Alport-Probanden in der pädiatrisch-nephrologischen Sprechstunde vorgenommen. Die Einwilligung der Eltern bzw. der mündigen Probanden entsprechend dem Ethik-Votum Nr. 1723-01/06 lag vor.

4.2.1 Gesundes Vergleichskollektiv

Für diese Untersuchung wurden gesunde Kinder und Jugendliche gewonnen, die sich einer einmaligen Blutentnahme unterzogen (Tabelle 1). Alle Probanden waren klinisch gesund. Es bestand keine auffällige Familienanamnese bezüglich Erythrocyturie, Proteinurie, chronischem oder akutem Nierenversagen mit nachfolgender Dialyse oder Nierentransplantation. Weiterhin bestanden keine auffälligen ophtalmologischen oder HNO-ärztlichen Befunde.

Tabelle 1: Charakterisierung des Vergleichskollektives

Proband	C1	C2	C3
Geschlecht	männlich	männlich	weiblich
Alter J./Mon.	11/8	21/11	9/4
Phänotyp	gesund	gesund	gesund
Familienanamnese	negativ	negativ	negativ
Creatinin Serum $\mu\text{mol/l}$	50	102	58
Kalkulierte GFR nach Schwartz ml/min./1,73 m^2	134,4	108	115,9
Albumin Serum g/l	42,9	42,4	46,8
Hochsensitives CrP Serum mg/l	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l
Urinstatus	unauffällig	unauffällig	unauffällig
Medikation	keine	keine	keine

Creatinin: NW Kinder: 27-62 $\mu\text{mol/l}$, NW Erwachsene: <115 $\mu\text{mol/l}$; GFR nach Schwartz: NW >90 (siehe Charakterisierung der Alportpatienten); Albumin: NW 30-52 g/l

4.2.2 Alportpatienten

Die Alportpatienten entstammten der nephrologischen Sprechstunde der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Tabelle 2). Alle Patienten wurden dort seit Jahren betreut. In circa viertel- bis halbjährlichen Abständen stellten sie sich zu Anamnese und einer klinischer Untersuchung vor. Sie erhielten regelmäßig laborchemische Untersuchung wie Urinstatus, Zählurin und Urinkultur. Es wurden regelmäßig eine Urinprotein/Creatinin-Ratio, eine Urinanalyse nach glomerulär oder tubulär ausgeschiedenen Proteinen, die Retentionsparameter, die Elektrolyte, die Gesamtprotein- und die Albuminwerte und die Blutgasanalyse im Blut mittels Routineverfahren untersucht. Die Nierensonographie diente zur Beurteilung des Nierenparenchyms, um Veränderungen in Bezug auf Mark-Rinden-Differenzierung (MRD) und die Echogenität des Gewebes nachvollziehen zu können. In die Untersuchungsreihe wurden nur Patienten mit histologisch gesichertem AS einbezogen. Bei allen war eine Hämaturie zu verzeichnen. Es fand sich ein eingeschränktes Hörvermögen bei zwei der vier Probanden. Nur ein Proband zeigte Veränderungen des

Sehapparates, die jedoch auch nicht typisch waren. Die Probandin war frei von diesen Symptomen.

Tabelle 2: Charakterisierung des Alportkollektives

Alportpatient	A1 A2	A3	A4	A5
Alter J./Mon.	12/1 ^{1. Untersuchung} 13/4 ^{2. Untersuchung}	18/4	16/11	9/1
Geschlecht	männlich	männlich	männlich	weiblich
Histologie	Alport	Alport	Alport	Alport
Augenbeteiligung	nein	nein	nicht typisch	nein
Audiometrie	sensineurale Schwerhörigkeit	sensineurale Schwerhörigkeit	nein	nein
Familienanamnese	positiv Erythrocyturie	positiv Erythrocyturie	unbekannt Adoptivkind	positiv Erythrocyturie
Creatinin Serum µmol/l	39 ^{1. Untersuchung} 35 ^{2. Untersuchung}	155	63	57
Kalkulierte GFR nach Schwartz ml/min./1,73 m²*	169,2 ^{1. Untersuchung} 254,2 ^{2. Untersuchung}	71,2	187,9	138
Albumin Serum g/l	29,8 ^{1. Untersuchung} 28,5 ^{2. Untersuchung}	36,1	35,3	40,8
Hochsensitives CrP Serum mg/l	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l	< 0,5 mg/l
Prot./Crea. Urin mg/mmol	294,4 ^{1. Untersuchung} 473,0 ^{2. Untersuchung}	551,5	479,1	68,6
Alb./Crea. Urin mg/mmol	248,4 ^{1. Untersuchung} 412,7 ^{2. Untersuchung}	437,35	373,6	34,5
IgG/Crea. Urin mg/mmol	4,21 ^{1. Untersuchung} 5,84 ^{2. Untersuchung}	8,28	8,0	3,3
α1-Mikroglob./Crea Urin in mg/mmol	2,12 ^{1. Untersuchung} 2,36 ^{2. Untersuchung}	3,21	1,2	3,9
Erythrocyturie pro µl	940 ^{1. Untersuchung} 270 ^{2. Untersuchung}	35	60	243
Ultraschall Niere	Echogenität ↑, MRD ↓, Zysten rechts, Nieren > P97	Echogenität ↑, MRD ↓	Echogenität ↑	MRD ↓
Medikation	Enalapril ^{1. Untersuchung} 5 – 2,5 mg Ramipril ^{2. Untersuchung} 2 x 2,5 mg	Enalapril 2 x 5 mg Hydrochloro- thiazid 1 x 10 mg	Ramipril 1 x 5 mg	keine
Blutdruck	unter ACE-Hemmern normotensiv	unter Blutdrucktherapie leicht hypertensiv	unter ACE- Hemmern normotensiv	normotensiv

Creatinin Serum $\mu\text{mol/l}$ NW Kinder: 27-62, NW Jugendliche: 44-88, NW Erwachsene: <115; kalkulierte GFR nach Schwartz ml/min./1,73 m^2 NW > 1 Jahr: >90; Albumin Serum g/l NW > 1 Jahr: 30-52; Prot./Crea. Urin in mg/mmol NW: < 40; Alb./Crea Urin mg/mmol NW: < 3,2; IgG/Crea Urin mg/mmol : NW < 1; $\alpha 1$ -Mikroglobl./Crea Urin mg/mmol NW: < 1; Erythrocyturie pro μl NW: <5; \uparrow : erhöht; \downarrow : vermindert

Bemerkung:

1. gleiche Farbgebung in Tabelle 1 und 2 bezeichnet Zuordnung und parallele Probenverarbeitung in der Versuchsreihe
2. Die erhobenen paraklinischen Parameter bestanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die Studie
3. Schwartz-Formel: $\text{Creatininclearance (ml/min./1,73 m}^2) = \text{Körperlänge (cm)} \times k / \text{Serumcreatinin (}\mu\text{mol/l)}$

k ist abhängig von Alter und Geschlecht:

Kinder 2 – 12 Jahre	48
Mädchen 13 – 21 Jahre	48
Jungen 13 – 21 Jahre	62 (Schwartz et al. 1976, Schwartz und Furth 2007)

4.3 Material

4.3.1 Blutentnahme

- BD Valu-Set Beckton Dickinson, Brasilien
- S-Monovette, Sarstedt, Nübrecht, Deutschland

4.3.2 Zweidimensionale Trennung

- Analyseplattform (CyBio AG, Jena)
- HiLoad Superdex G 200 Säule (16/60 Pharma)
- 96 deepwell Mikrotiterplatte
- Spectramax Plus³⁸⁴ (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)
- 96-fach-Dialysekammern (Patentnummer WO03/049841A1) mit Membran 0,025 μm , white VSWP14250 (Millipore, Billerica, MA, USA)
- 96-well UV-star Mikrotiterplatte oder 384 UV-star Mikrotiterplatte (Fa. Greiner-bio-one, 96-well Platte Nr. 655801, 384-well Platte Nr. 781801)

4.3.3 Tryptischer Verdau

- Thermocycler (PTC – 100; Firma Biozym)
- 96-fach-Dialysekammern (Patentnummer WO03/049841A1)
- pH-Meter (pH-Meter 765 Calimatic, Firma Knick)

- Thermometer
- PCR-Platte (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)

4.3.4 LC-ESI-MS/MS

- automatischer Probengeber FAMOS (Dionex)
- RP - HPLC Ultimate system (Dionex, Idstein, Deutschland)
- Nano - Spray - Nadel (New Objective, Woburn, MA, USA)
- Hybrid Quadropole/TOF MS/MS Massenspektrometer API QStar Pulsar (Applera, Deutschland, Darmstadt)

4.3.5 MALDI-MS

- Time-of-flight-Massenspektrometer (Voyager DE RP instrument, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)

4.3.6 Software und Datenbanken

- Windows (Microsoft), Excel (Microsoft), Access (Microsoft), SwissProt (www.expasy.org), Analyst QS Software, PRO.ID Version 1.e
- In-house-Software:
 - „ProteomProjekt vom 19.06.2005 und 03.11.2006“
 - „DatumPosWandlung.exe“
 - „Zusammenfügen.exe“

4.4 Methoden

4.4.1 Probengewinnung

Die Blutentnahme wurde ohne vorherige Medikamenteneinnahme zwischen 5.00 und 11.00 Uhr vormittags standardisiert mittels Venenpunktion (BD Valu-Set, Beckton Dickinson, Brasilien) in ein Serumblutentnahmeröhrchen (S-Monovette, Sarstedt, Nübrecht, Deutschland) durchgeführt. Nach Gerinnung (1 h, Raumtemperatur) wurde 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Die Sera wurden zu Portionen von 1100 µl aliquotiert

und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Zuvor waren die Proben, um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten, mit Patientencodierung, Zeitpunkt der Probenentnahme, Probenserie und fortlaufender Nummerierung innerhalb der Probenserie versehen. Die Patientencodierung und die Medikation wurden protokolliert. Vor der Blutentnahme wurden die Anamnese und der klinische Status erhoben.

4.4.2 Zweidimensionale Trennung

Trennung in der ersten Dimension - Größenausschlusschromatographie (SEC)

Das Patientenserum wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels Vortexer gemischt. 1080 µl Patientenserum wurden mit 120 µl Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) gemischt, 10 min. bei 10000 rpm und 10°C zentrifugiert und danach wurde 1 ml des Überstandes auf eine HiLoad Superdex G 200 Säule (16/60 Pharmacia) aufgebracht.

Bei einer Durchflussrate von 1 ml/min wurden dann 1 ml Fraktionen in einer 96 deepwell Mikrotiterplatte gesammelt. Dabei wurden die ersten 36 ml Vorlaufvolumen verworfen.

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Vertiefungen wurde mittels UV-Absorbanz-Messung bei Wellenlängen von 280, 215 und 205 nm quantifiziert. Die Säule war mit Thyreoglobulin (660 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), BSA (67 kDa), Chymotrypsin (25 kDa) und RNase (13,7 kDa) kalibriert worden.

Dialyse

Zwei Aliquots zu 250 µl von jeder der 96 Fraktionen wurden in der 96-fach Dialysekammer zwei Stunden bei 20°C dialysiert. Nach der ersten Stunde wurde die Dialyseflüssigkeit (10 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 25 mM NaCl) erneuert.

Trennung der zweiten Dimension - Anionenaustauschchromatographie (AEC)

Für diesen Trennschritt wurden verschiedene Varianten des Trennverfahrens verwendet. Die Proben A1, A2, A3 und C1 wurden, wie in Horn et al. 2006 beschrieben, getrennt: In einem Polychromatographie-Block befanden sich 96 parallele Säulen mit ca. 1ml DEAE-Zellulose. Es wurden 500 µl aller 1D-Fraktionen in jeweils 25 2D-Fraktionen à 250 µl

(insgesamt 2400 Fraktionen) getrennt. Die Fraktionierung erfolgte entsprechend dem Elutionsregime (Tabelle 3).

Tabelle 3: Elutionsbedingungen für die 2. Dimension, A1, A2 , A3 und C1

Fraktion	Konzentration		pH-Wert
	NaCl (mM)	Propanol (%)	
0-4	25	0	7,4
5-7	50	0	7,4
8-10	100	0	7,4
11-13	150	0	7,4
14-16	300	0	7,4
17-19	500	10	7,4
20-25	500	20	7,4

Medium für alle Elutionsschritte: 10 mM Tris/HCl

Die Proben aller weiteren Probanden wurden in einem verbesserten AEC-Verfahren getrennt (Kreusch et al. 2005). Dabei wurden 96 Einzelsäulchen mit 330 µl DEAE-Zellulose eingesetzt, nur 285 µl der 1D-Fraktionen getrennt und ein feinerer Stufengradient zur Elution verwendet (Tabelle 4). Eine spezielle Analyseplattform der Fa. CyBio AG, Jena (Publikation in Vorbereitung) erlaubt ein automatisches Vorgehen bei diesem Trennverfahren und die parallele Bearbeitung von zwei Proben gleichzeitig. Die so erhaltenen 2-D-Fraktionen wurden in 384-er Mikrotiterplatten gesammelt. Die Anzahl der getrennten Fraktionen beträgt nun 3360 (1-D: 96; 2-D: 35).

Tabelle 4: Elutionsbedingungen der 2. Dimension, feinerer Gradient, A4, A5, C2, C3

Fraktion	Konzentration		pH-Wert
	NaCl (mM)	Propanol (%)	
0-2	0	0	7,4
3-6	25	0	7,4
7-10	75	0	7,4
11-14	125	0	7,4
15-18	125	0	7,2
19-22	175	0	7,2
23-26	225	0	7,2
27-30	500	0	7,2
31-34	500	20	7,2

Medium für alle Elutionsschritte: 10 mM Tris/HCl

Die entstehenden Fraktionen sind durch zwei Nummern charakterisiert. Die erste Nummer kennzeichnet die Reihenfolge in der ersten Dimension und kennzeichnet nach Eichung das native Molekulargewicht. Proteine mit niedriger Fraktionszahl haben die

Säule als erstes passiert und sind relativ groß, kleine Proteine und Peptide gehören dementsprechend zu höher nummerierten Fraktionen. Die zweite Nummer charakterisiert die Reihenfolge in der zweiten Trennung. Je höher die negative Nettoladung der Proteine oder Peptide ist, desto später treten die Proteine in der zweiten Dimension durch die Säule und befinden sich somit in höher nummerierten Fraktionen.

4.4.3 Messung der Proteinkonzentration

Da die vorhandenen Proben in UV-star Mikrotiterplatten gesammelt worden waren, die eine UV-Absorbanzmessung ermöglichen, konnte die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen anhand ihrer Absorbanz bei 280 nm am Spectramax Plus³⁸⁴ ermittelt werden. Die Eichung wurde mit BSA durchgeführt.

4.4.4 Tryptischer Verdau

Denaturierung

45 µl ausgewählter Fraktionen nach 2-D Trennung wurden mit 15 µl 8 M Guanidin-HCl in PCR-Platten versetzt. Guanidin hebt die hydrophoben Wechselwirkungen auf und spaltet die Wasserstoffbrückenbindung. Danach wurden die Proben bei 90°C über 20 min im Thermocycler denaturiert.

Reduktion

Dithiothreitol (DTT) spaltet die Disulfidbrücken. Deswegen wurden 3 µl 10 mM DTT-Lösung in 20 mM Ammoniumhydrogenkarbonat den denaturierten Proben hinzugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde.

Modifikation

Die Proben wurden in der weiteren Verarbeitung mit 3 µl 50 mM Iodacetamid in 20 mM Ammoniumhydrogenkarbonat versetzt. Hierdurch wurde eine erneute Ausbildung der Disulfidbrücken verhindert, da sich Iodocetamid an die freien SH-Gruppen anlagert. Mit

Ammoniumhydrogenkarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Dieser Vorgang wurde bei Raumtemperatur bei Dunkelheit durchgeführt.

Dialyse

Danach wird wie oben beschrieben gegen 20 mM Ammoniumhydrogenkarbonat dialysiert.

Trypsin-Verdau

Trypsin spaltet die Aminosäurekette von Proteinen oder Peptiden nach den Aminosäuren Lysin und Arginin zu tryptischen Bruchstücken. Die zugegebene Trypsinmenge betrug 1/40 der Konzentration an Protein. Mit dem Zusatz des Trypsins wurden die Proben für 18 Stunden bei Raumtemperatur verdaut. Der tryptische Verdau wurde mit 3 µl 280 mM Ameisensäure beendet.

Verdünnung

In einem Bereich von ca. 1-2,5 µM ist die normierte Höhendsumme der Peptid-Signale linear zur Proteinkonzentration und ist somit ein valider Bereich für die Quantifizierung mittels MALDI-MS (Bublitz et al. 2006). In diesen Bereich wurden die Fraktionen verdünnt. Die aus der SEC ermittelte oder im Fall von Proteinkomplexen auch die theoretische Masse diente zur Errechnung der molaren Konzentrationen aus den globalen Proteinkonzentrationen, die anhand der UV-Absorbanz errechnet wurden.

4.4.5 Selektion von Fraktionen

Aus Kapazitätsgründen können nicht alle 2-D Fraktionen untersucht werden. Fraktionen verschiedener Proben, die nach der 2 D-Trennung gleiche Nummerierungen zeigen, werden als homolog bezeichnet. Für die Proteinkonzentrationen aller homologen Fraktionen der zu vergleichenden Proben wurde der Quotient $C_{\text{Alport}}/C_{\text{Control}}$ gebildet. Anhand der guten Präzision des Trennvorganges (Kreusch et al. 2005) sind Abweichungen der Proteinkonzentration um den Faktor 2 bereits signifikant. Homologe Fraktionen mit einem Quotienten kleiner als 0,5 oder mehr als 2 wurden für die weitere

Analyse ausgewählt, wenn sie von wenigstens zwei weiteren gleichsinnig veränderten Fraktionen umgeben sind (z.B. Tabelle 8: Fraktion 2-D 14; 1-D 58). Es wurden auch Quotienten außerhalb der angegebenen Referenzwerte akzeptiert, sofern sie sich auffällig von den umgebenden Fraktionen unterschieden (z.B. Tabelle 8: 2-D 9; 1-D 88 und 89) und in der Graustufendarstellung als „Flecken“ imponierten (ebenfalls Tabelle 8). Gerade Proteine, die sich in der SEC in hohen Fraktionszahlen z.B. 1-D > 88 darstellen, sind kleiner als 60 kDa und können Auskunft über Filtrationsverluste geben.

Dementsprechend erfolgte der tryptische Verdau in den die genannten Kriterien erfüllenden homologen Fraktionen. Das waren beispielsweise für das Proben-Paar A4-C2 58 Fraktionen, die Zahl ist auch bei den anderen Probanden ähnlich. Danach erfolgte die Analyse mittels LC-ESI-MS/MS zur Identifizierung enthaltener Proteine als Doppelbestimmung und anschließend mittels MALDI-MS zur Quantifizierung der nachgewiesenen Proteinketten als Vierfachbestimmung (Abbildung 2).

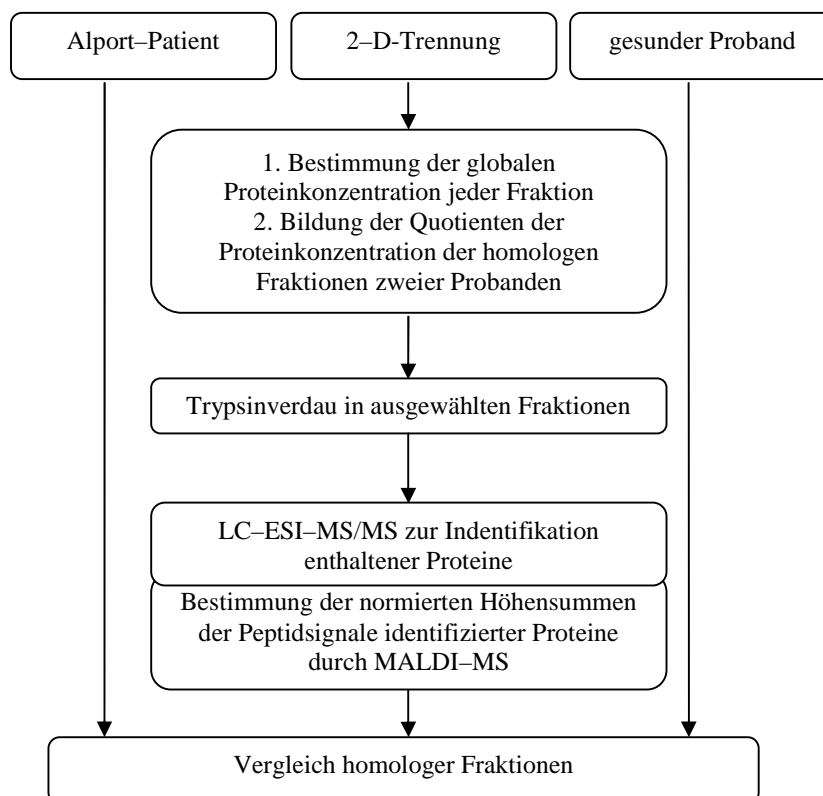


Abbildung 2: Arbeitsstrategie bei der Suche nach potentiellen Markern

4.4.6 MALDI-MS/Matrix

Es wurde ein Matrixgemisch aus 9 mg α -Cyano-4-hydroxymizsäure, 300 μ l Acetonitril, 300 μ l Propanol und 287 μ l Wasser hergestellt, dem 0,3 μ M Eichpeptid (AAGIFQFPRV-NH₂, Firma Jena BioScience GmbH) hinzu gegeben wurden, um die Signalhöhen zu normieren. Der pH-Wert wurde durch 3,6 μ l 25 % Trifluoressigsäure (Endkonzentration 0,1 %) in den sauren Bereich verschoben, um eine maximale Protonierung zu erreichen. Aus der Mischung von 10 μ l Matrixgemisch und 10 μ l Probe wurden vier 1 μ l Aliquots auf eine MALDI-Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Homologe Fraktionen wurden auf dieselbe MALDI-TOF-MS-Platte aufgebracht und dadurch unter vergleichbaren Bedingungen analysiert. Zuvor waren diese Fraktionen auf die annähernd gleiche molare Konzentration verdünnt und mit Eichpeptid versetzt worden.

4.4.7 LC-ESI-MS/MS (Liquid chromatography electro spray ionization mass-spectrometry/mass-spectrometry)

Die Identifizierung der in den ausgewählten Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgte durch die ESI-LC-MS/MS. 7,5 μ l der durch tryptischen Verdau entstandenen Proben wurde 7,5 μ l Lösung D (5 % Acrylnitril (ACN) und 0,04 % Ameisensäure) in Wasser (Merck HPLC-Grade) gemischt. Ein Microliter dieses Gemisches wurde einer RP-HPLC Ultimate system (Dionex, Idstein, Deutschland) zugeführt. Die Probeninjektion erfolgte mit einem FAMOS Autosampler (Dionex). Die Trennung wurde mit einer PepMap-Säule (75 μ m x 15 cm, C18, 3 μ m) durchgeführt. Dabei wurden folgende Gradienten verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 5: HPLC-Trennbedingungen

Zeit (min)	Flussgeschwindigkeit (μ l/min)	A (vol %)	B (vol %)
0-2	0.15	95	5
2-57	0.15	95 auf 30 linear fallend	5 auf 70 linear steigend
57-58	0.15	30 auf 0 linear fallend	70 auf 100 linear steigend
58-66	0.15	0	100
66-72	0.15	95	5
ab 72	0.05	95	5

Eluent A: 5 % ACN und 0,04 % Ameisensäure

Eluent B: 80 % ACN und 0,04 % Ameisensäure

Aus dem HPLC–Auslass gelangen die so getrennten Fraktionen über eine Nano-Spray-Nadel (New Objective, Woburn, MA, USA) in das Hybrid Quadropole/TOF MS/MS Massenspektrometer API QStar Pulsar i.

Der Datenerhebungsmodus bestand aus Zyklen von TOF–Scans, die 1,5 s betrugen. In jedem Zyklus wurden die Peptide mit einer m/z –Ratio von 400–1500 gemessen. Im Anschluss daran wurden durch vier jeweils 1,5 s betragende MS/MS quadrupole-TOF-Scans Peptide der m/z –Ratio 50–2000 analysiert. Die vier höchsten Signal-Intensitäten mit einer Ladung ≥ 2 wurden einer Fragmentierung zugeführt. Ein interner Algorithmus errechnete die notwendige Fragmentierungsenergie. Es erfolgte eine TOF-Kalibrierung mit Caesium (132,905 Da) und IGOR-Peptid (829,594 Da).

Die aus diesem Schritt erhobenen Daten wurden gegen die 7500 humane Aminosäuresequenzen beinhaltende SwissProt–Datenbank abgeglichen. Dabei wurde ProID Version 1.e verwendet und die in dieser Software vorhandenen Stringenzkriterien angewendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Stringenzkriterien der ProID-Software, Version 1.e

Konfidenz	Score
> 86	>11
≥ 86	>16
≥ 76	>17
≥ 71	>18
≥ 42	>19
≥ 0	>26

Der Score ist ein Qualitätsmaß für die gemessenen Signale der Peptidfragmente in der LC-ESI-MS/MS. Je höher der Scorewert ist, desto vollständiger sind die Fragmente im Massenspektrum detektiert worden. Die Konfidenz ist ein Maß für die Vertrauenswürdigkeit der Identifikation der fragmentierten Peptide in der verwendeten Datenbank. Der Algorithmus zur Berechnung der Konfidenz beruht auf dem Distance Score, der die Differenz zwischen dem Score des am besten zu den kalkulierten Massenfragmenten einer Peptidsequenz in der Datenbank passenden Massenspektrums eines Peptids und dem Score des nächstbesten passenden Peptids darstellt. Die Aussage dieser Wertepaare (Tabelle 6) wird vom Hersteller (Applied Biosystems) der Software als vertrauenswürdig eingestuft.

Ergebnisse der ESI-Analyse sind die Proteinidentifikationen und die Anzahl der sog. Finds. Diese entspricht der Anzahl der gefundenen Peptide, die einem Protein zugeordnet werden konnten. Dabei fließen gleiche und unterschiedliche Peptide ein.

4.4.8 MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)

Die Fraktionen wurden anschließend in einem Time-of-flight-Massenspektrometer erneut analysiert. Der Ionisationsvorgang erfolgte durch einen Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm im Linear- und im Reflektron-Modus (Bublitz et al. 2006). Die tryptischen Peptide wurden bei Beschleunigungsspannung von 20 kV, 68 % Gitterspannung und 185 ns Verzögerungszeit in dem Reflektron-Modus ausgesetzt und analysiert. Durch ein Peptid-Massen-Standard-Kit von Applied Biosystem (Darmstadt) erfolgte eine externe Massenkalisierung. Fünf primäre Spektren wurden erhoben, die gemittelt wurden. Jedes dieser primären Spektren entstammte 64 Einzelschussspektren.

4.4.9 In-silico-Verdau, verwendete Datenbank und Software

In-silico Verdau

Um mit der in-house-Software schnell arbeiten zu können, wurde eine eigene Peptidmassendatenbank aufgebaut. Hierbei wurden die durch die LC-ESI-MS/MS identifizierten Proteine zuerst einem virtuellen Verdau mit SwissProt (www.expasy.org) nach folgenden Kriterien unterzogen, wenn sie noch nicht in der hauseigenen Datenbank enthalten waren:

1. Modifikation mit Iodacetamid
2. missed cleavages maximal 3 (ungespaltene Trypsinspaltstellen)
3. Peptidmassen ≥ 500 Da
4. Alle postrationalen Modifikationen werden akzeptiert
5. Monoisotope Massen werden angegeben
6. Methionin ist oxidiert
7. Spaltendes Enzym: Trypsin
8. Die Peptidmassen werden ihrer Größe nach sortiert.

Datenbank

Die so gewonnen Datensätze wurden in einer Datenbank abgelegt, die immer wieder aktualisiert wurde. Da bis heute die genaue Zusammensetzung des Serumproteoms nicht bekannt ist, wurden zur Aktualisierung alle, in verschiedenen Fragestellungen im Serum identifizierten Proteine einbezogen. Mit diesem Vorgehen wurde die Datenbank bis zum Ende dieser Arbeit von ca. 600 auf 1940 Datensätzen erweitert.

Software

Die Methode und Software zur Zuordnung der Peptidmassen und Quantifizierung der Masse-Peaks des MALDI-TOF-MS wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ausgearbeitet. Die Signalhöhen aller sicher einem Protein zuordenbaren Masse-Peaks wurden addiert und anschließend durch die Peakhöhe des Eichpeptides dividiert. Dies ergibt die normierte Höhengsumme (Bublitz et al. 2006).

Zur Ermittlung der normierten Höhengsummen wurden folgende Parameter verwendet:

1. Modifikation durch Iodacetamid
2. nicht oxidiertes Methionin
3. maximale Massenabweichung von 0,5 Da
4. missed cleavage max. 1 (potentielle, jedoch ungespaltene Trypsin-Spaltstellen)
5. Coverage: prozentualer Anteil der gefundenen Aminosäuresequenz eines Proteins im Vergleich zur Gesamtlänge, mindestens 5 % notwendig
6. Anzahl der Peptidtreffer: Peptide eines Proteins, welche durch Abgleich mit den bekannten Peptidmassen, zugeordnet werden konnten. Diese werden im Vergleich zu den nicht eliminierten Bankpeptiden (Anzahl der gesamten Peptide des Proteins minus jener Peptide, deren Masse bei anderen Proteinen der selbigen Fraktion vorkommen) betrachtet. Eine Übereinstimmung von 5 % ist für die Quantifizierung notwendig.

Aus den jeweils vier Höhengsummen wurden mittels Excel Mittelwert, Standardabweichung und Streuung gebildet.

4.4.10 Kriterien der Auswahl der potentiellen Markerkandidaten

Für die Ermittlung potentieller Markerkandidaten gelten die folgenden Kriterien:

1. Die potentiellen Markerkandidaten mussten in der LC-ESI-MS/MS ≥ 2 Finds zeigen, die den Stringenzkriterien genügten (Tabelle 6). Finds entsprechen der Anzahl der gefundenen Peptide, die einem Protein zugeordnet werden konnten. Dabei fließen gleiche und unterschiedliche Peptide ein.
2. Bei den Paaren A4-C2 und A5-C3 mussten sich die Quotienten der normierten Höhendsummen der MALDI-TOF-MS gleichsinnig zu denen der mittels LC-ESI-MS/MS gesicherten Finds verhalten. Aufgrund methodischer Mängel (siehe Methoden und Auswertung A1-A2-A3 vs. C1) wurden in der Analyse A1-A2-A3 vs. C1 nur Erhöhungen in den Quotienten der normierten Höhendsummen Alport/Gesund mit gleichsinnigen Erhöhungen der Finds akzeptiert.
3. Die Peptidtreffer (siehe 4.4.9) im MALDI-TOF-MS umfassten mindestens 5 % der nicht eliminierten Bankpeptide.
4. Die Coverage (siehe 4.4.9) musste im MALDI-TOF-MS mindestens 5 % betragen. Jede Fraktion wurde viermal im MALDI-TOF-MS analysiert. Aus diesen vier Resultaten wurde dazu ein Durchschnitt gebildet.
5. Dabei wurden nur solche normierten Höhendsummen ausgewertet, bei denen die Streuung maximal 50 % betrug.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Datengewinnung

Die Datengewinnung soll zunächst anhand eines Beispiels aus dem Paar A4-C2 erläutert werden: Es ergab sich in der Fraktion 2-D 15; 1-D 65 nach der Absorbanzmessung eine Proteinkonzentration von 0,6359 mg/ml (Tabelle 8) beim Alportpatienten. Der Vergleichswert beim Gesunden lag bei 0,3097 mg/ml. Daraus ergab sich ein Quotient von 2,05. Die Quotienten der umgebenden Fraktionen betrugen 2,13 und 1,99. Folgende Proteine konnten innerhalb der Fraktion durch LC-ESI-MS/MS gesichert werden und wurden danach in ihren NHS durch die MALDI-TOF-MS bestimmt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Fraktion 2-D 15; 1-D 65 – Analyse der Founds und der NHS

Name	Swiss-Prot.	Founds		NHS		NHS Kriterien (Bemerkung)
		A4	C2	A4	C2	
Transcription factor E2F3	O00716	2	0	0,28	0,066	nicht erfüllt
Haptoglobin	P00738	0	5	0,1	0,072	erfüllt
Haptoglobin-related protein	P00739	0	3	0	0	nicht erfüllt
Alpha-2-macroglobulin	P01023	0	2	17,35	2,78	erfüllt
Ig alpha-1 chain C region	P01876	0	7	0	0	nicht erfüllt
Antileukoproteinase 1 (ALP)	P03973	0	3	0	0	nicht erfüllt
Ubiquitin-protein ligase E3	Q00987	4	0	0	0	nicht erfüllt
Stabilin-1	Q9NY15	2	6	1,67	0,28	nicht erfüllt
EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 2	Q9UHX3	2	0	0,48	0,19	erfüllt
Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B	Q9UIF8	2	0	0	0	nicht erfüllt
Synphilin-1	Q9Y6H5	2	5	0,38	0,026	erfüllt

Bemerkung – Kriterien zur Sicherung den NHS waren gegeben:

1. Die Peptidtreffer im MALDI-TOF-MS umfassten mindestens 5 % der nicht eliminierten Bankpeptide.
2. Die Coverages betrugen im MALDI-TOF-MS mindestens 5 %.
3. Dabei wurden nur solche normierten Höhensummen ausgewertet, bei denen die Streuung maximal 50 % betrug.

Das Protein EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 2 erfüllt die unter 4.4.10 genannten Kriterien für einen Biomarkerkandidaten als einziges innerhalb dieser Fraktion. Die beiden orange gefärbten Proteine Alpha-2-Makroglobulin und Synphilin-1 zeigen kein gleichsinniges Verhalten der NHS und der Founds – deswegen können sie nicht in engerem Sinn als Kandidaten gesehen werden.

Der Umfang der Datengewinnung soll anhand des Beispiels A4-C2 erläutert werden:

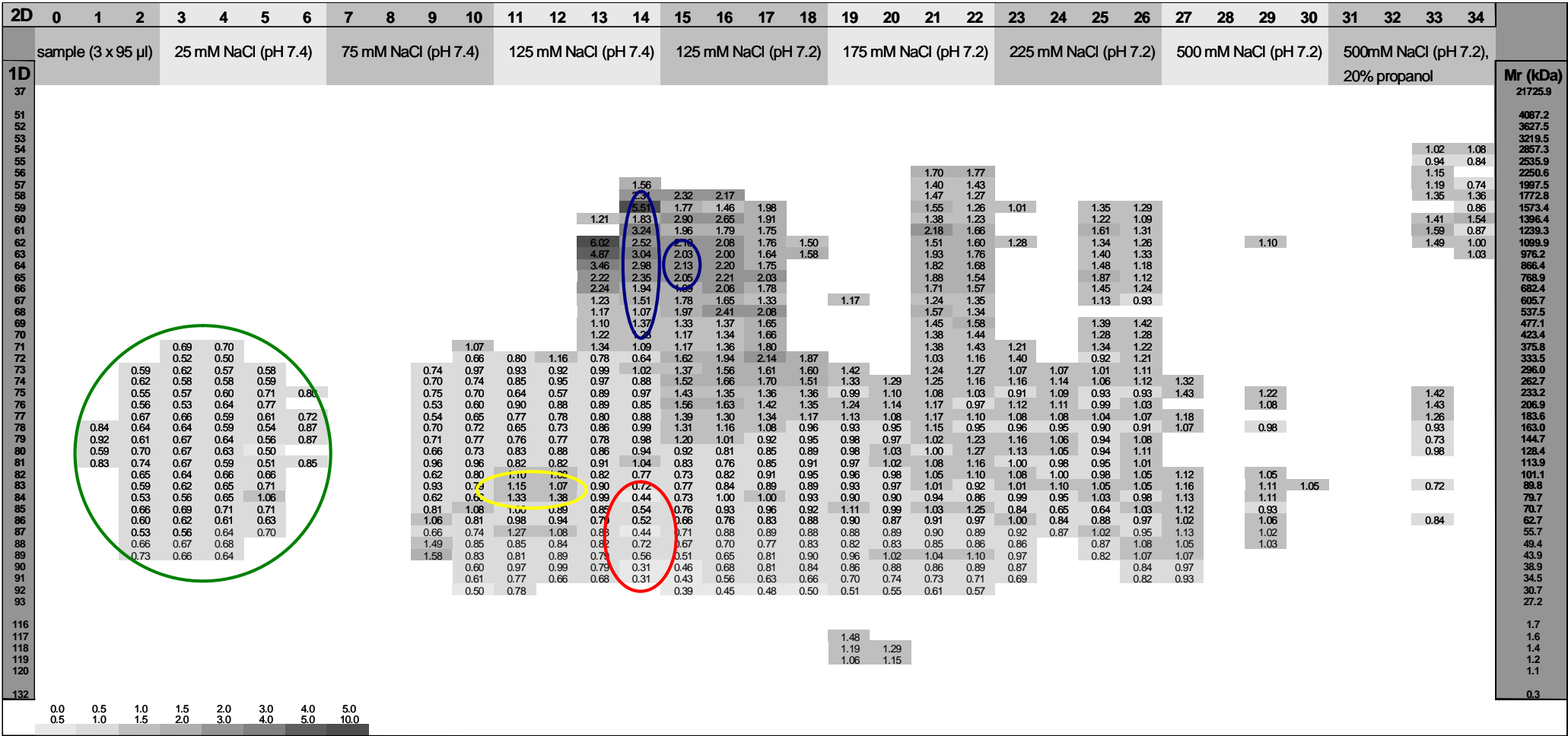
Aus der Analyse der Proteinkonzentration durch die Absorbanzmessung nach der zweidimensionalen Trennung (Tabelle 8) und Quotientenbildung ergaben sich 58 homologe Fraktionen (siehe Methoden und Tabelle 9), die weiter der LC-ESI-MS/MS zugeführt wurden. In einzelnen Fraktionen fanden sich bis zu 105 verschiedener Proteine. Insgesamt konnten ungefähr 1000 Proteine anhand der Finds und den in den Methoden beschriebenen Kriterien identifiziert werden. Für alle diese Proteine wurden die normierten Höhendsummen ermittelt. Für 370 Proteine waren die Kriterien (coverage, Peptidtreffer, Streuung der NHS) in einem Bereich, der eine weitere Analyse gestattete. Es ergeben sich daraus 42 verschiedene, den Kriterien entsprechende potentielle Markerkandidaten allein aus diesem Probenpaar.

Auch in den Untersuchungsreihen zu A1-A2-A3 vs. C1 und A5-C3 gelten vergleichbare Zahlen.

Tabelle 8: A4 (Alportpatient); 2-D-Trennung; Proteinkonzentration in mg/ml(280 nm); Erläuterung siehe Text

Fractionen 2D	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
	Proben (3 x 95µl)			25mM NaCl (pH 7.4) 10mM Tris als Lösungsmittel				75mM NaCl (pH 7.4) in allen Fraktionen				125mM NaCl (pH 7.4)			125mM NaCl (pH 7.2)			175mM NaCl (pH 7.2)			225mM NaCl (pH 7.2)			500mM NaCl (pH 7.2)			500mM NaCl (pH 7.2) und 20 % Propanol										
Fractionen 1D	Elutionsvolumen in µl																																				
37	0,003	0,001																	0,002			0,000	0,001				0,001			0,002	0,003	0,001	0,002	0,005	21726		
38	0,018		0,001	0,001	0,002			0,007	0,002			0,001	0,000	0,000						0,001	0,002		0,000	0,000		0,001	0,002		0,001			0,004	0,007	0,002	0,014	19282	
39		0,028	0,001		0,000				0,002	0,001	0,000	0,000	0,000							0,000	0,000		0,000	0,000		0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,004	0,007	0,002		17113		
40	0,001			0,001	0,000		0,001			0,002	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,002	0,001	0,000		0,003	0,003	0,002	0,003	0,005	0,004	0,014	0,005		15188			
41		0,003								0,002	0,001	0,000	0,001	0,002	0,002	0,001	0,000	0,003	0,002	0,001	0,000	0,003	0,002	0,001	0,001	0,000	0,001	0,002	0,002	0,004	0,003	0,005	0,009	0,026	0,012	0,006	11963
42	0,008	0,003	0,001	0,003	0,004	0,002	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,000	0,001	0,007	0,002	0,001	0,000	0,000	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,004	0,003	0,003	0,005	0,004	0,020	0,012	0,004	10618	
43	0,001	0,005	0,001	0,006	0,004	0,001	0,002	0,001	0,002	0,004	0,004	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,003	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,007	0,008	0,020	0,012	0,004	0,001	9423		
44	0,008	0,013	0,001	0,005	0,003	0,003	0,002	0,001	0,001	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	8363		
45	0,006	0,004	0,004	0,003	0,004	0,002	0,000	0,001	0,001	0,004	0,002	0,003	0,000	0,004	0,001	0,005	0,004	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,007	0,001	0,006	0,005	0,007	0,012	0,009	0,022	0,017	0,029	0,021		7423		
46	0,003	0,001		0,011	0,008	0,010	0,001	0,001	0,001	0,004	0,002	0,003	0,000	0,004	0,001	0,005	0,004	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,007	0,001	0,006	0,005	0,007	0,012	0,009	0,022	0,017	0,029	0,021		7423		
47	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,001	0,000	0,001	0,004	0,005	0,005	0,001	0,002	0,001	0,003	0,003	0,003	0,001	0,000	0,003	0,008	0,000	0,001	0,004	0,007	0,005	0,001	0,005	0,003	0,008	0,003	0,002	0,007	6588		
48	0,011	0,007	0,006	0,003	0,006	0,005	0,002	0,002	0,006	0,006	0,007	0,003	0,000	0,001	0,002	0,004	0,004	0,003	0,001	0,001	0,005	0,005	0,002	0,001	0,010	0,007	0,003	0,002	0,004	0,005	0,008	0,003	0,005	0,003	5847		
49	0,012	0,007	0,001	0,000	0,011	0,002	0,005		0,001	0,002	0,006		0,007	0,007	0,011	0,005	0,003	0,007	0,006	0,009	0,005	0,007	0,006	0,005	0,010	0,007	0,010	0,001	0,009	0,014	0,020	0,012	0,018	0,013	5189		
50	0,012	0,005	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002		0,004	0,004	0,004	0,001	0,000	0,005	0,005	0,005	0,004	0,006	0,002	0,002	0,010	0,011	0,005	0,004	0,009	0,008	0,006	0,007	0,009	0,002	0,001	0,022	0,021	0,021	4605		
51	0,002	0,004	0,001	0,002	0,002	0,004	0,004		0,010	0,007	0,008	0,006	0,122	0,008	0,011	0,008	0,006	0,008	0,009	0,006	0,007	0,024	0,020	0,010	0,007	0,015	0,011	0,009	0,007	0,010	0,018	0,017	0,018	0,038	0,028	4087	
52	0,007	0,014	0,010	0,015	0,015	0,011	0,008	0,008	0,003	0,008	0,010	0,004	0,007	0,008	0,018	0,020	0,024	0,024	0,021	0,017	0,018	0,045	0,033	0,021	0,018	0,030	0,028	0,021	0,022	0,030	0,031	0,027	0,024	0,054	0,058	3627	
53	0,002	0,003	0,003	0,004	0,003	0,000	0,001		0,010	0,008	0,010	0,004	0,009	0,014	0,014	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	3219		
54	0,001	0,005		0,005	0,006	0,006	0,001	0,005		0,005	0,013	0,004	0,007	0,026	0,020	0,020	0,024	0,022	0,029	0,017	0,023	0,085	0,072	0,039	0,029	0,051	0,047	0,034	0,018	0,044	0,038	0,022	0,013	0,055	0,059	2857	
55	0,002	0,005	0,008	0,003	0,002	0,004	0,005		0,006	0,014	0,011	0,005	0,005	0,013	0,028	0,027	0,025	0,028	0,030	0,022	0,020	0,081	0,081	0,034	0,025	0,044	0,039	0,027	0,023	0,037	0,039	0,028	0,018	0,066	0,057	2536	
56	0,003	0,007	0,005	0,006	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003	0,013	0,011	0,005	0,006	0,020	0,044	0,046	0,050	0,051	0,039	0,026	0,036	0,041	0,039	0,040	0,029	0,024	0,039	0,041	0,029	0,020	0,073	0,049	0,062	2251			
57	0,004	0,007	0,003	0,008	0,004	0,006	0,003	0,001	0,003	0,009	0,015	0,012	0,014	0,050	0,171	0,149	0,111	0,069	0,059	0,044	0,040	0,122	0,095	0,049	0,038	0,063	0,052	0,036	0,033	0,047	0,039	0,025	0,029	0,088	0,078	1773	
58	0,006	0,008	0,005	0,006	0,003	0,002	0,003	0,001	0,003	0,013	0,012	0,011	0,013	0,371	0,498	0,461	0,307	0,198	0,167	0,146	0,116	0,087	0,067	0,046	0,050	0,037	0,062	0,071	0,137	0,037	0,032	0,061	0,075	1573			
59	0,009	0,013	0,012	0,014	0,014	0,015	0,017	0,005	0,007	0,018	0,027	0,020	0,018	0,079	0,458	0,358	0,208	0,096	0,071	0,060	0,046	0,120	0,108	0,058	0,039	0,073	0,061	0,039	0,033	0,049	0,037	0,025	0,027	0,081	0,084	1396	
61	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,006	0,002	0,005	0,017	0,021	0,010	0,009	0,187	0,869	0,383	0,185	0,101	0,071	0,052	0,044	0,145	0,128	0,054	0,039	0,091	0,089	0,038	0,030	0,053	0,047	0,030	0,026	0,079	0,055	1239	
62		0,002	0,006	0,006	0,010	0,008	0,007	0,003	0,012	0,019	0,026	0,005	0,013	0,307	0,969	0,498	0,260	0,117	0,080	0,068	0,057	0,127	0,137	0,065	0,052	0,100	0,076	0,047	0,038	0,055	0,056	0,038	0,025	0,082	0,064	1100	
63	0,001	0,001	0,006	0,003	0,003	0,004	0,004	0,001	0,003	0,016	0,016	0,005	0,006	0,207	1,190	0,605	0,291	0,119	0,080	0,058	0,044	0,116	0,119	0,062	0,043	0,104	0,071	0,039	0,030	0,068	0,036	0,025	0,024	0,060	0,042	866	
65	0,003	0,002	0,004	0,007	0,002	0,003		0,002	0,015	0,018	0,008	0,015	0,174	1,112	0,636	0,330	0,145	0,083	0,059	0,054	0,117	0,103	0,054	0,047	0,107	0,081	0,038	0,031	0,045	0,030	0,018	0,017	0,070	0,052	769		
66	0,002	0,008	0,009	0,009	0,007	0,009	0,006	0,005	0,013	0,017	0,009	0,011	0,158	1,048	0,604	0,294	0,129	0,091	0,058	0,044	0,104	0,108	0,055	0,039	0,100	0,064	0,036	0,024	0,038	0,027	0,014	0,012	0,053	0,042	682		
67	0,002	0,0,																																			

Tabelle 9: Quotienten der Proteinkonzentrationen der homologen 2-D Fraktionen C_{A4}:C_{C2}



Graustufenscala der Konzentrationsquotienten A4/C2

umkreiste Areale: Fraktionen mit Veränderungen typischer Proteine(siehe im Text)

Im Folgenden werden alle die Kriterien (siehe Methoden) erfüllenden Kandidaten aus allen Probenpaaren tabellarisch vorgestellt. Potentielle Markerkandidaten werden daran anschließend im Einzelnen besprochen.

5.2 Auswertung Patienten A1-A2-A3 vs. Kontrolle C1

Die Gruppe A1-A2-A3 vs. C1 wurde zuerst analysiert. Innerhalb dieser Gruppe zeigten sich noch methodische Schwächen im Vergleich zu den Paaren A4-C2 und A5-C3:

1. Das Trennschema in der 2. Dimension war nicht so fein abgestimmt (siehe Methoden).
2. Anfangs bestanden technische Schwierigkeiten bei der LC-ESI-MS/MS (persönliche Mitteilung Dr. Kreusch).
3. Es konnte zu diesem Zeitpunkt kein altersgleicher Vergleichsproband zu A3 gewonnen werden.
4. Deswegen wurde die 2-D-Trennung des Alportpatienten A3 zeitlich getrennt und ohne Vergleich durchgeführt. Die MS-Analysen erfolgten zeitlich zusammen.

Damit erscheinen die Ergebnisse der potentiellen Markerkandidaten (Tabelle 10) im Vergleich zu den anderen Paaren nicht so sicher. Es wurden deshalb und aufgrund der Überlagerung mit Filtrationsverlusten nur Erhöhungen in den normierten Höhensummen im Vergleich Alport/Gesund akzeptiert, da eine Konzentrationserhöhung mit diesem Verfahren noch valider erscheint. Aus dem Genannten heraus sind die Ergebnisse der Analysen A4-C2 und A5-C3 in ihrer Aussage stärker zu gewichten als die dieses Analysevorganges. Andererseits sollten viel versprechende potentielle Kandidaten der Gruppe A1-A2-A3 vs. C1 wie Myosin-9, Kollagen alpha 2(IV) und ADAM 8 (s. u.) nicht außer Acht gelassen werden.

Tabelle 10: Potentielle Markerkandidaten aus A1, A2, A3

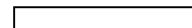
Name	Swiss-Prot.	Fraktion		NHS-Quotienten		
		2-D	1-D	A3/C1	A1/C1	A2/C1
ADAM 8	P78325	14	66			
Amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	P78348	16	78			
Arsenical pump-driving ATPase	O43681	14	66			
Calcineurin-binding protein Cabin 1	Q9Y6J0	14	66			
Collagen alpha 2(IV) chain	P08572	14	87			
Complement component C6	P13671	13	79			
Complement factor H	P08603	13	79			
Cullin-1	Q13616	13	78			
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	P26358	13	79			
Ecotropic virus integration 1 site protein	Q03112	14	66			
Folate transporter 1	P41440	13	79			
Hypothetical protein KIAA0329/KIAA0297	O15040	14	66			
Kinetochores-associated protein 1	P50748	13	79			
Microtubule-associated protein 1B	P46821	14	66			
Myosin-9	P35579	13	79			
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	Q13423	14	66			
Orphan nuclear receptor TR2	P13056	14	87			
Phosphoglycerate kinase, testis specific	P07205	11	65			
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5	Q9NR82	14	66			
Probable glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B, mitochondrial	O75879	14	66			
Protein arginine N-methyltransferase 3	O60678	14	66			
Ran-binding protein 2	P49792	14	66			
Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Q9NQ38	14	66			
Serine/threonine-protein kinase PLK1	P53350	13	79			
Thyroid receptor interacting protein 12	Q14669	14	66			
Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 4	P29074	16	77			
Zinc finger protein 294	O94822	14	66			

Erläuterung: Farbcodierung des Textes der ersten zwei Spalten steht für mittels ESI-MS/MS ermittelte Fonds:

im Normalserum oder beiden gefunden; **nur in Alport-Seren gefunden**

Farbcodierung der Felder der letzten drei Spalten steht für mittels MALDI-MS ermittelte normierte Höhendsummen:

Quotient > 0,5 und < 2



Quotient > 2



Quotient < 0.5



Potentieller Markerkandidat: Erhöhung in zwei Proben oder/und bei beiden Methoden

P099999: interne Nummer IgG gesamt

fette Schrift: im Text diskutierter Kandidat

Die potentiellen Kandidaten erfüllen die Kriterien formal. Sie werden jedoch nicht alle diskutiert, da anhand der Literatur kein Zusammenhang zur Pathogenese hergestellt werden konnte. Dennoch stellen sie prinzipiell potentielle Marker dar.

5.3 Patient A4 vs. Kontrolle C2

Alle in Tabelle 11 aufgeführten Proteine stellen potentielle Markerkandidaten dar. Es wurden auch Erniedrigungen der normierten Höhensummen im Vergleich Alport/Gesund akzeptiert. Hier konnte das genauere Trennschema durchgeführt werden, die ESI-LC-MS/MS verlief technisch einwandfrei, es standen vergleichbare Kontrollprobanden zur Verfügung, die Probenbearbeitung erfolgte absolut parallel.

Tabelle 11: Potentielle Markerkandidaten aus A4

Name	Swiss-Prot.	2-D	1-D	NHS/Founds A4/C2
3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	P18405	9	89	
ADAMTS-5	Q9UNA0	16	64	
Albumin	P02768	9	88	
Albumin	P02768	9	89	
Albumin	P02768	11	83	
Albumin	P02768	11	84	
Albumin	P02768	12	83	
Albumin	P02768	12	84	
Albumin	P02768	14	84	
Albumin	P02768	14	87	
Albumin	P02768	14	90	
Albumin	P02768	14	91	
Albumin	P02768	15	63	
Albumin	P02768	21	57	
Albumin	P02768	21	58	
Albumin	P02768	21	61	
Albumin	P02768	21	62	
Albumin	P02768	21	65	
Albumin	P02768	21	66	
Albumin	P02768	22	64	
Albumin	P02768	25	65	
Albumin	P02768	25	66	
Albumin	P02768	33	60	
Aldo-keto reductase family 1 member B10	O60218	15	63	
Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652	21	57	
Alpha-1-antitrypsin	P01009	14	84	
Alpha-1-antitrypsin	P01009	14	91	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	13	70	

Alpha-2-macroglobulin	P01023	13	71	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	58	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	59	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	63	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	64	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	68	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	69	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	90	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	15	58	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	15	63	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	15	65	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	16	58	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	16	65	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	16	72	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	17	60	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	17	65	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	17	68	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	21	61	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	21	62	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	21	65	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	22	63	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	22	64	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	25	65	
Apolipoprotein A-I	P02647	16	76	
Apolipoprotein A-I	P02647	17	59	
Apolipoprotein A-I	P02647	21	56	
Apolipoprotein A-I	P02647	21	66	
Apolipoprotein B-100	P04114	15	64	
A-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	P10398	17	68	
Asparagine synthetase	P08243	14	91	
Brain-specific angiogenesis inhibitor 2	O60241	15	93	
Cartilage-associated protein	O75718	11	84	
Centaurin-beta 2	Q15057	16	64	
Centaurin-beta 2	Q15057	17	68	
Chondroitin sulfate synthase 1	Q86X52	21	61	
Coatomer subunit beta	P53618	16	72	
Collagen alpha-1(VII) chain	Q02388	14	87	
Complement factor H	P08603	14	69	
Cytoplasmic protein NCK2	O43639	14	90	
DNA polymerase alpha catalytic subunit	P09884	11	84	
Dual specificity protein kinase CLK1	P49759	12	84	
Ectoderm-neural cortex 1 protein	O14682	15	58	
EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2	Q9UHX3	15	65	
Endoribonuclease Dicer	Q9UPY3	11	84	
F-box only protein 5	Q9UKT4	16	64	
Fibronectin	P02751	25	65	
Fibronectin	P02751	25	66	
Galactose-3-O-sulfotransferase 3	Q96A11	14	90	

Haptoglobin	P00738	14	68	
Haptoglobin	P00738	14	69	
Haptoglobin	P00738	15	63	
Haptoglobin	P00738	15	64	
Haptoglobin	P00738	16	65	
Haptoglobin	P00738	16	72	
Haptoglobin	P00738	16	73	
Haptoglobin	P00738	16	76	
Haptoglobin	P00738	17	59	
Haptoglobin	P00738	17	65	
Haptoglobin	P00738	22	64	
Hemopexin	P02790	11	83	
Hemopexin	P02790	11	84	
Hemopexin	P02790	12	83	
Hemopexin	P02790	12	84	
Ig alpha 1 chain C region	P01876	13	70	
Ig alpha 1 chain C region	P01876	15	64	
Ig alpha 1 chain C region	P01876	17	72	
Ig gamma 1 chain c region	P01857	11	84	
Ig mu chain C region	P01871	21	66	
IgG gesamt	P099999	21	56	
IgG gesamt	P099999	21	57	
Keratin typ II cytoskeletal 5	P13647	33	60	
Kinetochore-associated protein 1	P50748	14	69	
Mas-related G-protein coupled receptor member F	Q96AM1	14	84	
Megalin	P98164	16	58	
Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2	Q9UKX2	9	88	
Myosin-14	Q7Z406	14	68	
Myosin-4	Q9Y623	9	88	
Nuclear receptor coactivator 6	Q14686	14	87	
Phosphoglucomutase-1	P36871	14	64	
PR domain zinc finger protein 9	Q9NQV7	22	63	
Pregnancy zone protein	P20742	14	59	
Pregnancy zone protein	P20742	14	63	
Pregnancy zone protein	P20742	15	63	
Pregnancy zone protein	P20742	16	65	
Probable JmjC domain-containing histone demethylation protein 2C	Q15652	14	84	
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	O00507	14	64	
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	O00507	15	63	
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y	O00507	15	64	
Properdin	P27918	11	84	
Protein AATF	Q9NY61	16	63	
Protein flightless-1 homolog	Q13045	9	88	
Protein flightless-1 homolog	Q13045	15	63	
Protein vav-3	Q9UKW4	11	84	
Retinol-binding protein II, cellular	P50120	9	88	
Rho guanine nucleotide exchange factor 11	O15085	11	84	
Signal-induced proliferation-associated protein 1	Q96FS4	14	87	

Signal-induced proliferation-associated protein 1	Q96FS4	14	90	
Signal-induced proliferation-associated protein 1	Q96FS4	14	91	
Synphilin-1	Q9Y6H5	15	65	
Synphilin-1	Q9Y6H5	15	76	
Tenascin-X	P22105	15	76	
Torsin B	O14657	15	58	
Transferrin	P02787	9	88	
Transferrin	P02787	9	89	
Transferrin	P02787	11	83	
Transferrin	P02787	11	84	
Transferrin	P02787	12	83	
Transferrin	P02787	12	84	
Transferrin	P02787	21	57	
Transferrin	P02787	21	66	
Transmembrane protease, serine 13	Q9BYE2	14	90	
Vitamin D-binding protein	P02774	14	91	
Zinc finger protein 307	Q969J2	14	90	
Zinc finger protein 539	Q86XL7	11	83	
Zinc finger protein GLI3	P10071	16	63	
Zinc finger SWIM domain-containing protein 2	Q8NEG5	15	63	

Erläuterung:

MALDI/ESI: Anstieg NHS und Founds
schwaches Indiz, kein gleichsinniges Verhalten von Founds und NHS
Abfall NHS und Founds
P099999: interne Nummer IgG gesamt
fette Schrift: im Text diskutierter Kandidat



5.4 Patient A5 vs. Kontrolle C3

Alle in Tabelle 12 genannten Proteine stellen analog zu oben potentielle Markerkandidaten aus diesem Probenpaar dar.

Tabelle 12: Potentielle Markerkandidaten aus A5

Name	Swiss-Prot	2-D	1-D	NHS/Founds A5/C3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q99460	26	72	
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q99460	34	78	
Albumin	P02768	14	84	
Albumin	P02768	14	87	
Albumin	P02768	15	93	
Albumin	P02768	22	70	
Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763	14	84	
Alpha-1-antitrypsin	P01009	14	90	
Alpha-1-antitrypsin	P01009	15	93	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	14	59	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	15	72	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	16	72	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	22	70	
Alpha-2-macroglobulin	P01023	22	71	
Apolipoprotein A-I	P02647	14	87	
Apolipoprotein A-I	P02647	14	90	
Apolipoprotein A-I	P02647	15	75	
Apolipoprotein A-I	P02647	16	71	
Apolipoprotein A-I	P02647	16	72	
Apolipoprotein A-I	P02647	22	70	
Apolipoprotein A-I	P02647	22	71	
Apolipoprotein A-I	P02647	25	68	
Apolipoprotein A-I	P02647	26	72	
Apolipoprotein A-I	P02647	34	78	
Apolipoprotein B-100	P04114	14	75	
Apolipoprotein B-100	P04114	15	72	
Apolipoprotein C-III	P02656	34	42	
Coatomer subunit beta	P53618	13	71	
Coatomer subunit beta	P53618	13	74	
Coatomer subunit beta	P53618	14	90	
Coatomer subunit beta	P53618	15	72	
Complement C3	P01024	26	73	
DNA polymerase epsilon, catalytic subunit A	Q07864	14	75	
DNA polymerase epsilon, catalytic subunit A	Q07864	14	87	
Elongation factor 1-beta	P24534	10	75	
F-box only protein 5	Q9UKT4	13	71	
Galactose-3-O-sulfotransferase 3	Q96A11	14	90	

Galactose-3-O-sulfotransferase 3	Q96A11	15	93	
Haptoglobin	P00738	13	74	
Haptoglobin	P00738	13	75	
Haptoglobin	P00738	14	59	
Haptoglobin	P00738	15	75	
Haptoglobin	P00738	16	72	
Ig alpha-1 chain c region	P01876	13	71	
Ig alpha-1 chain c region	P01876	15	75	
Ig alpha-1 chain c region	P01876	16	72	
Ig mu chain c region	P01871	14	59	
IgG gesamt	P099999	5	84	
IgG gesamt	P099999	13	74	
IgG gesamt	P099999	14	76	
IgG gesamt	P099999	15	75	
IgG gesamt	P099999	34	78	
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	P19827	26	72	
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	P19823	26	72	
Megalin	P98164	15	72	
Mitochondrial intermediate peptidase, mitochondrial	Q99797	34	78	
NACHT, LRR and PYD-containing protein 14	Q86W24	15	72	
P2X purinoceptor 7	Q99572	14	84	
Pregnancy zone protein	P20742	14	59	
Probable phospholipid-transporting ATPase IC	O43520	13	74	
Proto-oncogene tyrosine protein kinase FES	P07332	13	74	
Solute carrier family 12 member 5	Q9H2X9	14	90	
Solute carrier family 12 member 7	Q9Y666	14	90	
Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	14	87	

Erläuterung:

MALDI/ESI: Anstieg NHS und Founds
schwaches Indiz, kein gleichsinniges Verhalten von Founds und NHS
Abfall NHS und Founds
P099999: interne Nummer IgG gesamt
fette Schrift: im Text diskutierter Kandidat



Als Ergebnisse konnten verschiedene Markerkandidaten definiert werden. Sie werden im Weiteren einzeln besprochen. Da nicht alle, sondern nur einzelne Fraktionen analysiert wurden, muss darauf hingewiesen werden, dass der Anstieg oder Abfall einzelner Proteine in homologen Fraktionen nur als Hinweis auf eine Konzentrations- oder Zustandsänderung gesehen werden kann.

5.5 Bekannte Serumproteinveränderungen

5.5.1 Bekannte Veränderungen der Serumproteinzusammensetzung

Da das methodische Vorgehen neu ist, geben diejenigen Befunde, die ansonsten gut bekannt sind die Sicherheit, dass die Methode verlässliche Resultate liefert. In allen untersuchten Gruppen fanden sich Veränderungen der NHS und Founds für das nephrotische Syndrom typischer Plasma-Proteine.

Albumin (P02768)

Davon sind vor allem die Hauptfraktionen, in denen sich Albumin nach 2-D-Trennung verteilt, betroffen. Diese erkennt man an den hohen Zahlenwerten der NHS beim Gesunden. Das Ergebnis korreliert gut mit den unfraktionierten Serumalbuminkonzentrationen der Alportpatienten, die immer unter den Werten der Gesunden lagen. Als weitere Bestätigung kann die Proteinurie/Albuminurie gesehen werden (Tabelle 1 und 2).

Allgemein werden Verminderungen des Albumins im Plasma durch verminderte Synthese (gestörte Leberfunktion oder Proteinmangelernährung), durch einen vergrößerten Verteilungsraum (capillary leak, Sepsis oder Schock) oder durch den Verlust des Proteins in einen dritten Raum hervorgerufen (Ödeme oder Aszites). Auch bei Verlusten nach extrakorporal wie z. B. beim nephrotischen Syndrom, der exsudativen Enteropathie oder Verbrennungen sinkt die Albuminkonzentration im Serum. Beim AS findet ein renaler Verlust statt. Ebenso erfolgt eine Erniedrigung des Albumins in der Akut-Phase-Reaktion und in der Schwangerschaft (Thomas 2000).

In den Paaren A4-C2 (Tabelle 9 im rotem Kreis und Tabelle 13) und A5-C3 zeigten sich Verminderungen im Bereich der Hauptfraktionen des Albumins. Die normierten Höhensummen waren in ihren 2-D Hauptfraktionen (A4-C2 1-D: Fraktionen 84-91, 2-D: Fraktionen 14) im Vergleich des Patienten A4 zum Gesunden C2 deutlich vermindert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht Albumin nach Fraktionen und normierten Höhendsummen A4-C2

Anstieg/Anfall NHS und Founds	2-D	1-D	Zahlenwert NHS C2	Zahlenwert NHS A4
	9	88	0	3,42
	9	89	0	1,48
	11	83	0	2,20
	11	84	0,01	1,28
	12	83	0,06	1,18
	12	84	0	2,04
	14	84	73,22	12,93
	14	87	17,00	4,44
	14	90	78,26	6,25
	14	91	41,39	1,46
	15	63	0,12	0
	21	57	0,12	0,02
	21	58	0,13	0,05
	21	61	0,26	0,02
	21	62	0,36	0,02
	21	65	0,42	0,05
	21	66	0	0,14
	22	64	0	0,36
	25	65	0	0,17
	25	66	0,01	0,17
	33	60	0,01	0,15

MALDI/ESI:

Anstieg NHS und Founds



Abfall NHS und Founds



Ein ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägte Bild ergab sich in dem Paar A5-C3 und in der Gruppe A1-A2-A3 vs. C1 (prinzipiell wurden aus erwähnten Gründen Erniedrigungen der normierten Höhendsummen in dieser Gruppe nicht akzeptiert).

Möglicherweise erklärt sich der Abfall der normierten Höhendsummen bei den Alporterkranken auch zu einem kleineren Teil aus der inversen Reaktion des Albumins bei entzündlichen Vorgängen, wie sie bei renalem fibrotischen Umbau bekannt sind. Deutlich im Vordergrund dürften jedoch die Filtrationsverluste stehen. Das wird dadurch bekräftigt, dass bei keinem der Alportpatienten ein hochsensitives C-reaktives Protein als Entzündungsmarker nachgewiesen werden konnte.

Immunglobulin G (IgG) (P099999)

Als weiterer Hinweis für die Validität können die normierten Höhendsummen des IgG herangezogen werden. Es wurde bei A1-A2-A3 vs. C1 vor allem in den Hauptfraktionen

ein Abfall des IgG gefunden. Bei diesen AS-Patienten zeigte sich auch ein deutlicher renaler Verlust des IgG, wie er in der Urinproteindifferenzierung erkennbar wird (siehe Methoden). Das traf auch auf das Paar A4-C2 zu. In bestimmten Fraktionen (Tabelle 9 im grünen Kreis) befindet sich überwiegend IgG. Der Quotient $C_{A4}:C_{C2}$ lag meist unterhalb 0,7. Im Gegensatz dazu ließ sich kein deutlicher Abfall des IgG im Serum bei dem Paar A5-C3 nachvollziehen. Die Proteinurie in Bezug auf großmolekulare Proteine wie das IgG war hier geringer ausgeprägt (siehe Methoden).

Alpha-1-Antitrypsin: (P01009)

Alpha-1-Antitrypsin gehört zu den Akut-Phase-Proteinen. Es ist ein Serinproteaseinhibitor und inaktiviert durch Bildung irreversibler Komplexe Elastase, Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin. Seine molekulare Masse beträgt 56 kDa. Bei akuten oder chronischen Infektionen steigt es um ein Mehrfaches an (Thomas 2000). Eine Verminderung findet sich bei hereditären Mangelerkrankungen, die mit Lungenemphysem, Leberfibrose und sehr selten mit einer Pannikulitis einhergehen. Möglicherweise ist es auch mit Glomerulonephritiden assoziiert (Lisowska-Myjak 2005). Abgesehen von einer Fraktion beim Alportpatienten A2 (14/66) fand sich in allen weiteren Fraktionen ein Abfall des Proteins. Es ist ein renaler Verlust anzunehmen, da Alpha-1-Antitrypsin eine molekulare Masse ähnlich Albumin hat und bei allen Patienten eine Albuminurie vorlag. Gestützt wird diese Vermutung durch die Verminderung dieses Proteins im Serum bei Patienten mit nephrotischem Syndrom (Joven et al. 1997). Weiterhin ist die vermehrte Ausscheidung im Urin bei nephrotischem Syndrom bekannt (Vaziri et al. 1994).

Serotransferrin: P02787

Serotransferrin ist ein Transportprotein, das zwei $Fe(3+)$ -Ionen in Assoziation mit einem Anion, normalerweise Bikarbonat, bindet. Es transportiert Eisen von den Orten der Absorption und des Häm-Abbaus zu den Orten der Speicherung und Nutzung. Möglicherweise hat es auch Aufgaben in der Zellproliferation (SwissProt-Datenbank). Transferrin hat eine Größe von 79,57 kDa (Thomas 2000).

Es konnte eine Erniedrigung der normierten Höhensummen bei Transferrin bei den Patienten A1-A2-A3 im überwiegenden Teil der Fraktionen nachgewiesen werden. In nicht einer der untersuchten Fraktion stiegen die normierten Höhensummen. Verluste durch Proteinurie sind bekannt. Verminderungen des Serumtransferrins sind z. B. beim nephrotischen Syndrom bekannt, die ihre Ursache in ungenügender Neubildung bei renalen Proteinverlust haben (Kemper et al. 1999, Lu et al. 2006, Vaziri 2001).

Im Paar A4-C2 (Tabelle 9, gelber Kreis) fand sich jedoch ein deutlicher Anstieg des Serumtransferrins. Der Anstieg ließ sich in allen Hauptfraktionen nachweisen. Auch in den Nebenfraktionen kam es zu einem, wenn auch nicht so ausgeprägten Anstieg. Das ist nicht mit Literatur in Deckung zu bringen. Erhöhungen des Serumtransferrins im AS sind nicht bekannt und nicht plausibel:

1. Obwohl die Bildung von Transferrin im nephrotischen Syndrom oft erhöht ist, können die Filtrationsverluste nicht ausgeglichen werden (Vaziri 2001).
2. Setzt man beim AS eine chronische Inflammation voraus, so müsste das Transferrin abfallen (Ganz 2006).
3. Auch ein Anstieg im Rahmen einer veränderten Serumeiweißkomposition wie beim nephrotischen Syndrom findet nicht statt (Joven et al. 1997).

Damit bleibt der Anstieg innerhalb des zuletzt genannten Paares unklar, das Verhalten des Transferrin innerhalb der Untersuchten uneinheitlich.

In der Gesamtbetrachtung verweisen diese bekannten und nachgewiesenen filtrationsbedingten Veränderungen auf die Glaubwürdigkeit der Methode, d. h. die Aussagekraft der Methode in Hinsicht auf bisher unbekannte Veränderungen.

Auf weitere potentielle Marker treffen Filtrationsverluste möglicherweise ebenfalls zu.

5.5.2 Wahrscheinlicher Proteinverlust durch Filtration

Es wurde ein Protein gefunden, dessen Konzentration anhand der Quantifikatoren NHS und Founds beim AS abnahm, was sehr wahrscheinlich filtrationsbedingt ist.

Zinc-alpha-2-glycoprotein: P25311

Zinc-alpha-2-glycoprotein ist ein Glykoprotein von 38–41 kDa und wurde in diversen Körperflüssigkeiten nachgewiesen. Weiterhin wurde es in der Niere in proximalen und distalen Tubuli, jedoch nicht im Bereich der Sammelrohre oder der Glomeruli dokumentiert (Tada et al. 1991). Funktionelle Informationen über dieses Protein lassen sich in der Literatur zwar finden, ein Zusammenhang zum AS lässt sich trotz des Nachweises der Verminderung der normierten Höhensummen beim AS-Patienten A5 im Vergleich zu C3 nicht herstellen. Da das Protein ein kleineres Molekulargewicht als Albumin zeigt, könnte die verminderten normierten Höhensummen Ausdruck eines Filtrationsverlustes sein. Dieser Verlust lässt sich bei keinem weiteren Alporterkranken nachweisen. Damit erübrigt sich auch seine Rolle als potentieller Marker.

5.6 Potentielle Biomarker-Kandidaten

Die gefundenen potentiellen Marker-Kandidaten (Kriterien: 4.4.10, Tabellen 10, 11 und 12) wurden einer Literaturanalyse unterzogen. In der SwissProt-Datenbank (www.expasy.org) wurde nach dem primären Ort der Synthese gesucht. Weiterhin wurden dieser Quelle erste Informationen über die Funktion des Markerkandidaten entnommen, soweit diese nicht allgemein bekannt war. Eine weitere Literaturrecherche erfolgte zur Bestätigung der gewonnenen Informationen und um fundiertere Angaben über Syntheseort und Funktion zu erhalten. Anhand dieser Informationen wurde versucht, den potentiellen Markerkandidaten in die Ätiopathogenese des AS theoretisch einzuordnen. Konnte kein Zusammenhang hergestellt werden, schied der potentielle Markerkandidat für die folgende Erörterung aus. Das bedeutet: im Nachfolgenden sind nur noch solche Serum-Markerkandidaten aufgeführt, für die ein Zusammenhang mit der Grunderkrankung wahrscheinlich gemacht werden konnte. Da aus Kapazitätsgründen nicht alle potentiellen Markerkandidaten zukünftig auch validiert werden können, sind diese theoretischen Überlegungen die Basis für die Vorauswahl einer nachfolgenden Validierung, die jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit erfolgen kann. Es können jedoch Proteine ohne bisher bekannten Zusammenhang zum AS potentielle Markerkandidaten sein.

Es konnten eine Reihe potentieller Marker definiert werden, die sich in die Pathogenese des AS einordnen ließen. Keiner der Kandidaten ließ sich jedoch über alle Patienten hinweg mit einem Abfall oder mit einem Anstieg der normierten Höhendsummen und Founds nachweisen. Hierfür lassen sich verschieden Gründe anführen:

1. Physiologisch bestehende interindividuelle Unterschiede.
2. Die Patienten befanden sich in verschiedenen Erkrankungsstadien.
3. Einflussfaktoren, die nicht in Zusammenhang mit dem AS stehen, verändern einen potentiellen Kandidaten beim Gesunden oder auch beim Alportpatienten, so dass eine Differenz zwischen beiden nicht mehr zu messen ist.
4. Die relativ kleine Stichprobe bildet selbst bei potentiell hoher Genauigkeit der Methode die wirkliche Verteilung der potentiellen Markern in der Alportpopulation nicht adäquat ab.
5. Der hochkomplexe Analysevorgang birgt die Gefahr von Fehlern, die das Ergebnis verfälschen
6. Einträge anderen Ursprungs, z. B. bei verschiedenen Syntheseorten, können das Ergebnis verfälschen.

5.6.1 Potentielle Marker aus der Inflammation/Akut-Phase-Reaktion

Der Körper reagiert auf Gewebsverletzungen, Entzündung oder Infektion durch koordinierte systemische metabolische Veränderungen oder auf lokale Entzündungen mit der Akut-Phase-Reaktion. Der Sinn dieser Reaktion besteht in der Wiedererlangung der Homöostase. Charakteristika der systemischen Antwort sind Fieber, Neutrophilie, Veränderungen im Lipidmetabolismus, Hypoferrämie and Hypozinkämie, erhöhte Glukoneogenese, erhöhter Proteinkatabolismus und erhöhter Transfer von Aminosäuren vom Muskel in die Leber, Komplement- und Gerinnungsaktivierung, hormonelle Veränderungen und Induktion der Akut-Phase-Proteine.

Innerhalb der Akut-Phase-Proteine wird zwischen Typ I, induziert durch Interleukin-1-artige Cytokine, und Typ II, induziert durch Interleukin-6-artige Cytokine, unterschieden (Moshage 1997).

In der Untersuchungsreihe konnten Veränderungen verschiedener Akut-Phase-Proteine Typ 1 und 2 gefunden werden, die diskutiert werden. Es bleibt jedoch zu betonen, dass

alle Untersuchten Probanden und Patienten negativ auf hochsensitives C-reaktives Protein waren. CrP wird von Interleukin-1-artigen Cytokinen stimuliert. Interleukin-6-artige Cytokine wirken hier im Allgemeinen synergistisch in Bezug auf Typ-1-Akut-Phase-Proteine (Moshage 1997). Interleukin 6 hat eine zentrale aktivierende Stellung in der Akut-Phase-Reaktion (Epstein 1999). Auch eine alleinige hypothetische Stimulation durch Interleukin-6-artige Cytokine müsste mit einem CrP-Anstieg einhergehen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen veränderten Proteinen um Frühmarker, die mit anderen Methoden validiert werden müssen.

Haptoglobin: P00738

Haptoglobin bindet Hämoglobin, um eine renale Ausscheidung zu vermeiden. Durch diese Komplexbildung sollen die Nieren vor Schaden durch die Hämoglobinausscheidung geschützt werden. Gleichzeitig macht das Haptoglobin das Hämoglobin zugänglich für degradierende Enzyme. Die Haptoglobinkonzentration im Serum ist abhängig vom Haptoglobintyp. Es wird zwischen 1-1, 1-2 und 2-2 unterschieden. Grundlage dieser Unterscheidung ist ein genetischer Polymorphismus. Der vorherrschende Typus Mitteleuropas ist 1-2. Die Haptoglobinsubtypen sind mit einer sehr unterschiedlichen Serumhaptoglobinkonzentration assoziiert. Auf Grundlage dieses Polymorphismus sind die Referenzbereiche für Haptoglobin sehr breit. Haptoglobin ist zwischen 85 (1-1) und 160 kDa (2-2) groß (Thomas 2000).

Das Haptoglobin steigt in der akuten Phase an. Es wirkt antioxidatorisch und unterstützt die Wundheilung (Epstein 1999). Auch beim nephrotischen Syndrom ist das Haptoglobin im Serum erhöht. Andere Zustände, die mit einem erhöhten Haptoglobin einhergehen sind intra- oder extrahepatische Cholestase und Eisenmangelanämie. Zustände mit erniedrigter Haptoglobinkonzentration im Serum können hämolytische Anämie, akute oder chronische Lebererkrankungen, Malabsorptionssyndrom oder eine angeborener Haptoglobinmangel sein, der bei 30 % der Bevölkerung Nigerias und bei ca. 1/1000 Kaukasiern auftritt (Thomas 2000).

Beim Alportpatient A4 ließ sich ein Anstieg des Haptoglobins im Vergleich zu C2 nachweisen, was sich in die bekannten Veränderungen beim nephrotischen Syndrom

einordnet. Auch Alportpatientin A5 zeigte den Anstieg des Haptoglobins. Die Proteinurie war jedoch milder ausgeprägt.

In der terminalen Niereninsuffizienz steigt das Haptoglobin ebenso an (Kaysen 1998). Beide Erkrankte befanden sich jedoch nicht in diesem Erkrankungsstadium. Damit scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus.

In den anderen Proben konnte sich dieser Anstieg nicht nachweisen lassen. Von den oben erwähnten Erklärungen (siehe 5.6) ist speziell bei Haptoglobin der sehr weite Referenzbereich durch unterschiedliche Haplotypen zu erwähnen. Bei A1-A2-A3 vs. C1 könnte ein Kontrollproband mit einer physiologisch hohen Haptoglobinkonzentration mit Alportpatienten verglichen worden sein.

Alpha-2-Makroglobulin: P01023

Alpha-2-Makroglobulin ist ein Proteaseinhibitor. Er kann alle vier Klassen von Proteasen inhibieren. Dieser Vorgang erfolgt über eine spezielle Region innerhalb des Proteins. Gelangt eine Protease in den Bereich dieser speziellen Region erfolgt eine Veränderung in der Konformation des alpha-2-Makroglobulins und die Protease wird eingefasst. Erniedrigtes alpha-2-Makroglobulin findet man bei der Freisetzung großer Mengen an Proteasen wie bei Pankreatitis (Thomas 2000). Es sind noch weitere Funktionen des alpha-2-Makroglobulins bekannt (Borth 1992) (Tabelle 13).

Tabelle 13: Liganden, Bindungsmechanismen und Funktion des alpha-2-Makroglobulins

Ligand	Mechanism that mediates binding	Biological significance
Proteinases	Trapping, $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ linkage	"Proteinase inhibition" clearance, targeting, import and processing of foreign peptides
Cytokines	Hydrophobic, zinc, disulfide linkage	Alteration, targeting, clearance of cytokine, modulation of cell growth and function
Toxin	Disulfide linkage	Unknown
Other peptides	Transglutaminases catalyse $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$ linkage	Unknown
Bacteria	Unknown	Opsonization
Virus	Terminal sialic acids	Opsonization, inhibition of virus infection
Various peptides	Ion exchange	Unknown
Zinc	Coordinated chelation of peptides, e.g., IL-1 β , others?	Carrier

Quelle: Borth 1992

Innerhalb des untersuchten Kollektivs fanden sich Erhöhungen des alpha-2-Makroglobulins bei den Alportpatienten A4 (Tabelle 9, blaue Kreise) und A5 in den Hauptfraktionen. Innerhalb der Gruppe A1-A2-A3 fanden sich in verschiedenen Fraktionen sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der normierten Höhendsummen.

Es bestehen Analogien zum Anstieg des Haptoglobins: alpha-2-Makroglobulin zählt zu den Akut-Phase-Proteinen (Thomas et al. 2004, Moshage 1997) und es ist auch beim nephrotischen Syndrom erhöht (Housley 1968). Wie später noch ausgeführt wird, spielen im AS Matrixmetalloproteinasen eine Rolle in der renalen Pathologie. Möglicherweise kommt es auf Grundlage der Wirkung dieser Enzyme zu einem Anstieg des alpha-2-Makroglobulins als Inhibitor von Proteasen. Möglicherweise ist der Anstieg durch einen Summationseffekt aller drei Erklärungsmöglichkeiten verursacht.

Hemopexin: P02790

Im Gegensatz zu Haptoglobin wurde Hemopexin lange nicht in Zusammenhang mit der Akut-Phase-Reaktion gebracht. Inzwischen mehren sich jedoch Hinweise, dass es in dieser Reaktion doch eine Rolle spielt. Die hepatische Bildung konnte durch IL-6 und IL-1 stimuliert werden (Immenschuh et al. 1994, Immenschuh et al. 1995). Weiterhin wirkt es antioxidatorisch (Epstein 1999).

Es hat eine hohe Affinität zu Hämderivaten. Nach Spaltung von Hämoglobin in Häm- und Globinanteil verbringt es den Hämanteil in das retikulo-endotheliale System. Ist aufgrund stärkerer Hämolyse das Haptoglobin nicht mehr messbar, erniedrigt sich auch das Hemopexin. Die Erniedrigung ist messbar erst ab Hämderivatkonzentrationen von 6 mg/l. Erniedrigte Hemopexinspiegel finden sich bei stärkeren Hämolysen, bei chronischen Lebererkrankungen, bei Porphyria cutanea tarda, beim Malabsorptionssyndrom und beim nephrotischen Syndrom. Erhöhtes Hemopexin findet sich bei schnell wachsenden Melanomen und scheint mit dem Tumorwachstum zu korrelieren (Thomas 2000). In den letzten Jahren wird dem Hemopexin auch eine Proteaseaktivität zugeschrieben (Bakker et al. 2005). Diese Proteaseaktivität bringen diese Autoren in Beziehung zur minimal change disease. Diese Erkrankung ist die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Kindesalter. Zumeist spricht sie gut auf Kortikosteroide an. Insgesamt wird eine immunologische Imbalance für diese

Erkrankung verantwortlich gemacht. Die genaue Ursache ist jedoch bisher nicht zu bestimmen. Bakker fand bei akuter Erkrankung mit großer Proteinurie ein erniedrigtes Hemopexin mittels Antikörpernachweis. In der Remission, bei gesunden Kontrollen oder bei Erkrankungen wie fokal segmentaler und fokal globaler Glomerulosklerose, IgA-Nephritis oder membranoproliferativer Glomerulonephritis fand er diese Abnahme nicht. Die Ausscheidung im Urin war in der Gruppe mit minimal change disease am größten. Weiterhin maß er die Proteaseaktivität des Hemopexins gegen glomeruläre Matrixmoleküle und fand die höchste bei der minimal change disease im akuten Schub. Dieses Messergebnis widerspricht der Abnahme der Serumkonzentration des Hemopexins. Hieraus postuliert er, dass nicht die Konzentration des Hemopexins gesunken sei, sondern dass aufgrund einer molekularen Konfigurationsänderung die Konzentration nur scheinbar abgesunken sei. In einem weiteren Artikel (Bakker et al. 2005) vermutet er, dass das Hemopexin per se Ursache der glomerulären Läsionen ist. Nur innerhalb des Paares A4-C2 wurde ein erhöhtes Hemopexin beim Alportpatienten gefunden. Möglicherweise ist der Anstieg Ausdruck einer frühen Phase der Inflammation. Andererseits ist durchaus denkbar, dass das Hemopexin sich auch gegen die glomerulären Matrixmoleküle wendet und somit Läsionen im glomerulären Apparat mit verursacht. Mit der hier benannten Methode kann das Hemopexin unabhängig von Konformationsveränderungen gemessen werden, was mit der von Bakker gemessenen erhöhten Proteasenaktivität bei scheinbar niedrigerer Konzentration korrelieren würde.

Alpha-1-acid-Glycoprotein 1: P02763

Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 ist ein Akut-Phase-Protein. Die Synthese wird kontrolliert von Glukokortikoiden, IL-1 und IL-6. Sie steigt um das fünf- bis fünfzigfache bei entzündlichen Vorgängen (SwissProt-Datenbank). Es scheint die Aktivität des Immunsystems zu modulieren. Weiterhin soll es antithrombotische Eigenschaften zeigen (Moshage 1997). Es gehört zur Lipocalinfamilie (SwissProt-Datenbank). Für Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 sind Verbindungen zu renalen Erkrankungen bekannt. Beispielsweise ist Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 in der chronischen Niereninsuffizienz erhöht (Romão et al. 2006). Am murinen Modell der renalen Ischämie und Reperfusion wirkt es antiapoptotisch und antiinflammatorisch (Daemen et al. 2000). Am Tiermodell des

Puromycin-induzierten nephrotischen Syndroms normalisierten hohe Dosen Alpha-1-acid-Glycoproteins 1 die glomeruläre Barriere.

Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 wurde im Paar A5-C3 mit einer Erhöhung der normierten Höhensummen bei der Alportpatientin A5 nachgewiesen. Bei ihr war noch keine Minderung der glomerulären Filtrationsrate vorhanden. Die Proteinurie war mild ausgeprägt. Die Nierensonographie wies nur geringere parenchymatöse Veränderungen auf. Trotzdem erscheint es zumindest möglich, dass es sich bei dem Anstieg dieses Proteins um den Ausdruck renaler Reparations- oder Umbauvorgänge handelt.

Es gibt jedoch ernsthafte Einwände gegen die Einordnung als potentiellen Marker: nur in diesem Paar ist der Anstieg nachgewiesen. In den anderen Paaren, die zudem eine ausgeprägtere Proteinurie zeigten oder bei dem Patienten mit bereits eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate, konnte das Protein nicht die geforderten Kriterien erbringen. Im Paar A4-C2 war das verwandte, ebenfalls aus der Lipocalinfamilie stammende Alpha-1-acid Glycoprotein 2 (s.u.) nachzuweisen. Es fiel jedoch in den normierten Höhensummen bei dem Alportpatienten.

Alpha-1-acid Glycoprotein 2: P19652

Alpha-1-acid-Glycoprotein 2 ist ebenfalls ein Akut-Phase-Protein. Bei Inflammation steigt es an. Es scheint ebenso wie Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 die Aktivität des Immunsystems zu modulieren und wird selbst vergleichbar reguliert (SwissProt-Datenbank). Der Zusammenhang zu chronischen Nierenerkrankungen ist für dieses Protein noch weniger nachgewiesen als für das verwandte Alpha-1-acid-Glycoprotein 1.

Nur im Paar A4-C2 wurde ein Abfall der normierten Höhensummen beim Alportpatienten gemessen. Im Gegensatz dazu stieg das Alpha-1-acid-Glycoprotein 1 in A5-C3 an. Möglicherweise ist der Abfall des kleinen Alpha-1-acid -Glycoprotein 2 (ca. 23 kDa unprozessierter Precursor) jedoch nur Ausdruck der ausgeprägteren Proteinurie.

Komplementfaktoren C3: P01024, C6: P13671, Faktor H: P08603

Im AS gilt die Rolle des aktivierten Komplementes als untergeordnet. In der Histologie findet man jedoch gelegentlich renale Ablagerungen von Komplementkomponenten.

Hierbei sind C3, C4 und die Immunglobuline M und G beschrieben. Diese befinden sich im Bereich des Mesangiums und in den glomerulären Kapillaren. Der Befund wird als unspezifisch angesehen. Komplementveränderungen im Serum sind für das AS unbekannt.

Innerhalb des Paares A5-C3 wurde eine Serumerhöhung des Komplements C3 nachgewiesen. C3 ist die zentrale Komponente aller drei Wege der Komplementaktivierung. Es ist zu bedenken, dass bei Akut-Phase-Reaktionen C3, das nicht nur in der Leber, sondern auch in Makrophagen gebildet wird, erhöhte Konzentrationen auftreten können (Moshage 1997, Thomas 2000).

Bei A1, A3 und bei A4 wurde eine Erhöhung des Faktors H beim Alporterkranken festgestellt. Dieser Faktor H ist im Plasma präsent und übernimmt dort und an der Oberfläche epithelialer Zellen die Kontrolle des alternativen Komplementweges. Erkrankungen, die mit Veränderungen im Faktor H einhergehen, sind das atypische hämolytisch urämische Syndrom (Zipfel et al. 2006). Weitere Erkrankungen mit Zusammenhang zum Faktor H sind die membranproliferative Glomerulonephritis Typ II und die altersbedingte Makuladegeneration Typ 4 (Zipfel et al. 2006).

In diesem Zusammenhang muss auch die Komplementkomponente C6 besprochen werden: sie stieg bei den Alportpatienten A1 und A3 im Vergleich zu den gesunden Probanden. Es wurde am C6-knock-out-Modell der Ratte nachgewiesen, dass nach 5/6-Nephrektomie die Tiere mit dem Komplementdefekt in Bezug auf tubulointerstitielle Fibrose einen deutlich günstigeren Verlauf zeigen (Nangaku et al. 2002). Hierbei wurde besonders auf den fehlenden Nachweis des Membranangriffkomplexes C5b-9 im proximalen Tubulusbürstensaum verwiesen, dessen Bestandteil C6 ist.

Insgesamt erscheinen die gefundenen Erhöhungen der Komplementfaktoren am ehesten nicht direkt in Verbindung zum AS zu stehen, sondern Ausdruck inflammativer und/oder renaler fibrotischer Umbauvorgänge zu sein. Trotzdem ist die Erhöhung von drei Komplementkomponenten etwas überraschend und bedarf weiterer Untersuchungen.

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2: P19823 und H1: P19827

Beide Proteine werden in der Leber synthetisiert. Neben den schweren Ketten H1 (60 kDa) und H2 (70 kDa) existiert eine weitere schwere Kette H3 (90 kDa) und eine

leichtere Kette – Bikunin (30–45 kDa). Die Gene aller drei schweren Ketten und des Bikunins befinden sich auf unterschiedlichen Chromsomen. Alle schweren Ketten und das Bikunin existieren als isolierte Moleküle, unterliegen jedoch auch Assoziationsvorgängen und werden zu den unterschiedlichen Molekülen der Inter-alpha-Inhibitor-Familie zusammengesetzt (Moriyama et al. 2001). Diese Proteinfamilie wird in Verbindung zur Inflammation (Witte et al. 1982), zu malignen Erkrankungen, zum Nierenversagen und zur Nephrourolithiasis gebracht (Moroyima et al. 2001). Die H2-Kette ist in den Zellen und Lumen der Tubuli und der Sammelrohre der Niere der hyperoxalurischen Ratte nachgewiesen. Die H1-Kette findet sich nur im Bereich der Sammelrohre. In der Niere der gesunden Ratte gelang der Nachweis der H1- und der H2-Kette nur im Bereich der Lumina der Tubuli und der Sammelrohre. Im tubulären Interstitium und im Bereich der Glomeruli gelang der Nachweis gar nicht. Den schweren Ketten wurden als Teil des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors Transportfunktionen für Hyaluronsäure im Plasma nachgewiesen. Außerdem fungieren sie als Bindungsprotein zwischen Hyaluronsäure und anderen Matrixproteinen (SwissProt-Datenbank). Weiterhin stabilisiert der Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor zusammen mit der Hyaluronsäure die extrazelluläre Matrix (Bost et al. 1998).

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 und H2 wurden im Paar A5-C3 mit einer Erniedrigung im Alportkaskus nachgewiesen. Beide Proteine befanden sich auch innerhalb einer Fraktion. Eine Erniedrigung ließe sich zum einen durch eine Proteinurie erklären, die bei der Alportpatientin aber nicht ausgeprägt war. Alternativ sind Zusammenhänge zu Inflammation und zur Veränderung der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Fibrose möglich. Insgesamt ist die Markerkandidatenfunktion dieser beiden Proteine eher zu verneinen.

Vitamin-D-bindendes Protein: P02774

Vitamin-D-bindendes Protein ist ein multifunktionelles Protein, das sich in Plasma, Aszites, Liquor cerebrospinalis, Urin und auf der Oberfläche verschiedener Zellen finden lässt. Im Plasma transportiert es Vitamin D und verhindert die Polymerisation von freigesetztem Aktin. Vitamin-D-bindendes Protein bindet an membrangebundene Immunglobuline auf B-Lymphozyten und an den Immunglobulin-Fc-Rezeptor auf T-

Lymphozyten. Es gehört zur Albumin/Alpha-Fetoprotein/Vitamin-D-bindendes Protein/Afamin-Familie. Seine Größe beträgt zwischen 51–58 kDa. Der Großteil des Proteins wird in der Leber produziert (SwissProt-Datenbank).

Nur 5 % des im Plasma zirkulierenden Proteins sind mit Vitamin D beladen. Durch seine aktinbindende Funktion spielt es bei akuten Nekrosevorgängen eine Rolle: wird Aktin bei Nekrose aus dem Intrazellulärraum freigesetzt, so löst es in Verbindung mit Gerinnungsfaktor 5a eine disseminierte intravasale Koagulation aus, die letztendlich zum Multiorganversagen führt. Vitamin-D-bindendes Protein bindet Aktin in Verbindung mit Gelsulin und überführt Aktin dadurch zum Abbau ins hepato-reticulo-endotheliale System. Niedrige Konzentrationen des Proteins wurden in Fällen von Polytrauma, Paracetamolüberdosierung, Leberversagen, multiplem Organversagen und Sepsis gemessen (Meier et al. 2006).

Es wurde im Paar A4-C2 ein vermindertes Vitamin-D-bindendes Protein beim Alportpatienten gemessen. Hinweise für im letzten Absatz besprochene klinisch-pathologische Zustände fanden sich nicht. Alportpatient A4 zeigte zwar eine deutliche Proteinurie und Hinweise für fibrotische Umbauvorgänge, die mit Zelltod verbunden sind, in der Sonographie. Hierbei ist jedoch anzunehmen, dass die Nekrosevorgänge sehr langsam ablaufen und deswegen keinen Einfluss auf die Konzentration des Vitamin-D-bindenden Proteins haben sollten. In der Zusammenschau bleibt es sehr fraglich, ob damit das Vitamin-D-bindende Protein als Markerkandidat benannt werden kann. Aufgrund der Molekularmasse und der deutlichen Proteinurie des Patienten A4 scheint am ehesten ein Filtrationsverlust wahrscheinlich.

5.6.2 Potentielle ätiopathogenetische Marker

Proteine, die in den AS-Proben in den konzentrationsabhängigen Parametern verändert gefunden wurden, die nicht im Zusammenhang mit bekannten Veränderungen der Akut-Phase-Reaktion bzw. dem nephrotischen Syndrom stehen, für die jedoch aufgrund ihres Vorkommens, ihrer Regulation bzw. Rolle im Stoffwechsel ein Bezug zur Ätiopathogenese des AS sehr wahrscheinlich ist, werden im folgenden als potentielle Marker betrachtet. Dazu zählen 1. ansteigende (Kollagen alpha2(IV), Myosin 9, Myosin 14, ADAM 8) und 2. im Serum abfallende Proteine (Cytoplasmic protein NCK2).

Kollagen alpha2(IV): P08572

Die alpha-2-Ketten des Kollagens IV dominieren die primordiale glomeruläre Basalmembran.

Es wurde nachgewiesen (Kalluri et al. 1997) (Abbildung 3/4), dass die alpha1- und alpha2-Ketten während der Maturation der GBM durch alpha3-, alpha4- und alpha5-Ketten ersetzt werden. Diese Maturation ist beim AS aufgrund der genetischen Veränderungen gestört. Die alpha1- und alpha2-Ketten sind für proteolytischen Abbau viel empfindlicher als die im reifen Stadium vorhandenen Ketten des Kollagens IV. Damit verliert die GBM an Integrität und Stabilität. Es erfolgt ein vermehrter Abbau des Kollagens. Hieraus lassen sich Symptome wie Proteinurie und Erythrocyturie ableiten.

Antibody	Control kidney					Alport kidney				
	GBM	TBM	BCBM	MM	VBM	GBM	TBM	BCBM	MM	VBM
$\alpha 1$	-/+	++	++	++	+	++	++	++	++	+
$\alpha 2$	-/+	++	++	++	+	++	++	+	+	+
$\alpha 3$	++	+	-/+	-	++	-	-	-	-	-/+
$\alpha 4$	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha 5$	++	-/+	-	-	-	-	-/+	-	-	-
$\alpha 6$	-	-	++	-	-/+	-	-	-	-	-

Abbildung 3; $\alpha 1$ -6: $\alpha 1$ -6-Ketten des Kollagen IV; GBM: glomeruläre Basalmembran; TBM: tubuläre Basalmembran; BCBM: Basalmembran der Bowmanschen Kapsel; MM: mesangiale Matrix; VBM: vaskuläre Basalmembran, Quelle: Kalluri et al. 1997

Die Proteinurie wiederum stimuliert die weitere Fibrosierung des Nierengewebes und den damit verbundenen Funktionsverlust (Nangaku 2004).

Antibody	Newly formed nephrons	Maturing nephrons	Mature glomeruli		
			GBM	MM	BCBM
$\alpha 1$	+	+	—	+	+
$\alpha 2$	+	+	—	+	+
$\alpha 3$	—	—	+	—/+	+/-
$\alpha 4$	—	—	+	—	—
$\alpha 5$	—	—/+	+	—	—/+
$\alpha 6$	—	—	—	—	+

Abbildung 4; $\alpha 1$ -6: $\alpha 1$ -6-Ketten des Kollagen IV; GBM: glomeruläre Basalmembran; MM: mesangiale Matrix; BCBM: Basalmembran der Bowmanschen Kapsel, Quelle: Kalluri et al. 1997

Bei Alportpatient A3 konnte ein den Kriterien genügendes Ansteigen des Kollagens $\alpha 2(IV)$ nachgewiesen werden. Bei diesem Patienten konnte anhand der Urinproteindifferenzierung und des Creatinins die am weitesten fortgeschrittene Niereninsuffizienz nachgewiesen werden. Der Befund ließe sich ohne weiteres in den Rahmen der pathogenetischen Prozesse einordnen:

1. Eine vermehrte Produktion an $\alpha 2(IV)$ -Ketten ist notwendig, um die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Moleküle zu ersetzen.
2. Durch vermehrte Proteolyse werden $\alpha 2(IV)$ -Ketten vermehrt freigesetzt und sind dann im Serum nachweisbar. Beide Vorgänge können die Konzentrationserhöhung im Serum erklären.
3. Möglicherweise ist die erhöhte Konzentration auch eine Summation beider Vorgänge.
4. $\alpha 5(IV)$ -Ketten sind in 80 % beim X-chromosomalen AS mittels Antikörper in der EBM nicht nachzuweisen (Muda et al. 2003), was man bei der Diagnostik durch Hautbiopsie nutzt (Yoshioka et al. 1994). Es ist zu diskutieren, ob die erhöhten normierten Höhendsummen des Kollagen $\alpha 2(IV)$ ihre Ursache eventuell in vermehrtem Turnover in der Haut haben, die ein sehr großes Organ darstellt. Für die zukünftige Verwendung des Proteins als Marker des X-chromosomalen AS ist die Herkunft jedoch nur untergeordnet von Bedeutung.

Obwohl der Anstieg von Kollagen alpha2(IV) in den anderen Paaren so nicht nachgewiesen werden konnte, soll das Protein aufgrund des plausiblen Zusammenhanges zum AS als potentieller Markerkandidat angesehen werden.

Myosin 9: P35579

Erkrankungen, die ihre Ursache mit Veränderungen im Gen Myosin 9 haben, präsentieren sich klinisch und histologisch mit ähnlichen Veränderungen, wie sie für das AS beschrieben sind. Zuerst zeigen sie jedoch Veränderungen im Bereich der Thrombozyten im Sinne von Makrothrombozytopenien. Im Einzelnen gehören zu diesem Erkrankungskreis folgende Entitäten:

1. May-Hegglin Anomalie (OMIM 155100)
2. Sebastian Syndrom (OMIM 605249)
3. Fechtner Syndrom (OMIM 153640)
4. Epstein Syndrom (OMIM 153650)
5. nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 (OMIM 603622)

Das MYH9-Gen befindet sich auf dem Chromosom 22q12.3 bis 13. Dieses Gen kodiert für das nonmuskuläre Myosin IIa (NMMHC-IIa), das zusammen mit dem verwandten nonmuskulären Myosin IIb, u. a. der Zytokinese, der Zellmobilität, der Chemotaxis und der Aufrechterhaltung der Zellarchitektur in nichtmuskulären Zellen dient (Sellers 2000). NMMHC-IIa wird in Thrombozyten, Leukozyten, Nieren und der Cochlea und weiteren Geweben exprimiert (Kawamoto und Adelstein 1991, Lalwani et al. 2000, Toothaker et al. 1991). Der Vererbungsmodus ist autosomal dominant. Die klinische Ausprägung ist zwischen den einzelnen Erkrankungen unterschiedlich und reicht von der erwähnten

Clinical Feature	May-Hegglin Anomaly	Sebastian Syndrome	Fechtner Syndrome	Epstein Syndrome
Macrothrombocytopenia	Yes	Yes	Yes	Yes
Leukocyte-inclusions (Döhle-like bodies)	Yes (parallel filaments)	Yes	Yes	No
Hearing impairment	No	No	Yes	Yes
Cataract	No	No	Yes	No
Nephritis	No	No	Yes	Yes

Abbildung 5: klinische Ausprägung der MYH9 assoziierten Erkrankungen, Quelle: Seri et al. 2003

Makrothrombopenie über Leukozyteneinschlüsse bis hin zu Schwerhörigkeit, Katarakt und Nephritis mit terminaler Niereninsuffizienz (Abbildung 5) (Seri et al. 2003).

Bisher ist nicht völlig geklärt, warum es selbst innerhalb einer Familie zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der Erkrankungen kommt. Gerade für die Nephritis postulieren Seri et al., dass eine Mutation innerhalb des MYH9-Genes nicht ausreicht und zusätzliche genetische oder Umweltfaktoren oder multiple Genprodukte mit in Betracht gezogen werden müssen. Interessanterweise sind die nephrohistologischen Veränderungen dieser Erkrankungsgruppe denen des AS nicht unähnlich. Auch hier zeigt sich die glomeruläre Basalmembran lammeliert und verdickt, die Veränderungen treten eher fokal auf. Die Fußfortsätze der Podozyten sind vergrößert, die Podozyten sind rarefiziert. Weiterhin finden sich mesangiale Zellproliferation, eine vermehrte mesangiale Matrix und eine Tubulusatrophie (Arrondel et al. 2002). In dieser Arbeit wurde NMMHC-IIa durch Immunfluoreszenz in den Glomeruli, den arteriolen und peritubulären Endothelzellen und dem Bürstensaumepithel der proximalen Tubuli nachgewiesen. Innerhalb der Glomeruli zeigten die glomerulären endokapillären Zellen und die Podozyten diese Expression. Die Podozyten tragen entscheidend zur Ausbildung der Schlitzmembran bei, sind an der Ausbildung der glomerulären Basalmembran beteiligt und sind über α - β Dystroglycan mit der glomerulären Basalmembran verbunden (Oh et al. 2004, Durvasula und Shankland 2006). Es ist durchaus vorstellbar, dass in der Funktion alterierte Podozyten und eine fehlerhafte glomeruläre Basalmembran die Ursache der Nephritis innerhalb dieser Erkrankungsgruppe sind. Patienten mit Epstein-Syndrom scheinen eine normale Kollagen-IV-Verteilung in den renalen Basalmembranen zu zeigen (Naito et al. 1997).

Bei den Alporterkrankten A1 und A3 ließ sich im Vergleich zu den Gesunden ein in der Serumkonzentration erhöhtes NMMHC-IIa nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist der vermehrte Übertritt in das Serum durch einen vermehrten Untergang der Podozyten. Die Podozyten lagern sich nicht direkt dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren an, sondern sind durch die glomeruläre Basalmembran getrennt (Tryggvason et al. 2006) (Abbildung 6). Dieser Übertritt des Proteins in die Kapillaren erscheint bei an sich gestörter Filtrationsbarriere denkbar. Die Haut könnte mit ihrer veränderten EBM beim X-chromosomalen Alport zu einer relevanten Erhöhung von Myosin 9 im Serum

führen. Jedoch wurde das Protein nicht direkt in der Haut, sondern nur in Hautanhangsgebilden wie Haarfollikeln, Zähnen oder Tränendrüsen des Maus-Embryos gefunden. Zu bedenken ist, dass Myosin in diesem Modell eine weite Verbreitung in verschiedenen Geweben hat und somit eine Verfälschung des Messergebnisses möglich ist (Marigo et al. 2004).

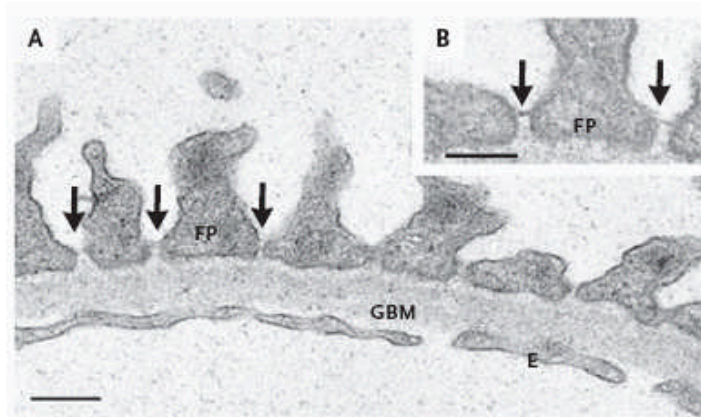


Abbildung 6:
Elektronenmikroskopie von
regelrechtem Gefäßendothel (E),
glomerulärer Basalmembran
(GBM) und Fußfortsätzen (FP)
der glomerulären Kapillaren
schwarze Pfeile deuten auf die
Schlitzmembran zwischen den
Fußfortsätzen
schwarze Striche entsprechen
250 nm (A), 150 nm (B)
Quelle: Tryggvason et al. 2006

In der Gruppe A4-C2 und A5-C3 konnte kein erhöhtes NMMHC-IIa bei den Alportpatienten gemessen werden. Jedoch war das verwandte Myosin 14 (NMMHC-IIc) bei Patient A4 erhöht.

Myosin 14: Q7Z406

Zu der Familie des nonmuskulären Myosins II gehört auch das kürzlich entdeckte Myosin IIc. Mutationen lösen eine autosomal dominante nichtsyndromale Form der sensineuralen Taubheit aus (Donaudy et al. 2004).

Myosin 14 (NMMHC-IIc) lässt sich anhand der mRNA und eines immunologischen Protein-Nachweises auch in der Niere nachweisen (Golomb et al. 2004). Die genaue intrarenale Lokalisation ist bisher nicht bekannt. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Funktion des Myosins 14 in der renalen Lokalisation. Aufgrund der Verwandtschaft zum Myosin bleiben jedoch ähnliche Aufgaben zu vermuten: Zytokinese, Zellmobilität, Chemotaxis und die Aufrechterhaltung der Zellarchitektur in nichtmuskulären Zellen.

Dieses Protein konnte beim Alportpatienten A4 mit einem Anstieg identifiziert werden. Damit gelang es, abgesehen von A5 und A2, in allen weiteren untersuchten Proben der

Alporterkranken, einen Anstieg entweder von NMMHC IIa oder NMMHC IIc im Vergleich zu den Gesunden nachzuweisen. Damit sollte der NMMHC II-Familie als potentieller Markerkandidat nachgegangen werden. Zu bedenken ist analog zum Myosin 9 der Nachweis dieses Proteins in verschiedenen Geweben und sich daraus zu erwartende verbreitete Fehlregulationen (Marigo et al. 2004).

Cytoplasmic protein NCK2: O43639

Zwischen den Endothelien und den Podozyten befindet sich die GBM. Auf dieser bilden die Podozyten ein Geflecht von Fußfortsätzen aus. Zwischen diesen Fußfortsätzen befindet sich ein Geflecht von Proteinen, die in ihrer Gesamtheit die glomeruläre Schlitzmembran bilden. Diese podozytären Schlitzmembranen sind die glomerulären Filter (Abbildung 6). Als wichtige Bestandteile des Filtrationsgeflechtes ist neben Podozin, Nephrin und anderen auch NCK2 zu nennen. NCK2 scheint ein Adaptermolekül zu sein, dass mit tyrosinphosphorylierten Wachstumsfaktoren assoziiert ist und Nephrin an das Aktinskelett der Podozyten bindet (Tryggvason et al. 2006). In den Podozyten ist dieses Proteingeflecht an Aktin gebunden. (Tryggvason et al. 2006). NCK2 liegt intrazellulär. Es sind verschiedene genetische Erkrankungen beschrieben, bei denen Mutationen im Bereich dieser Schlitzmembranproteine zu hereditären nephrotischen Syndromen führen. Beispiele sind Mutationen von Nephrin oder Podozin, die zu steroidresistenten, teilweise kongenitalen nephrotischen Syndromen führen (Tryggvason et al. 2006).

Im Unterschied zu den beschriebenen nephrotischen Syndromen ist im AS jedoch die GBM mit ihren bereits beschriebenen Veränderungen im Kollagenensemble Ursache des pathogenetischen Geschehens. Es ist jedoch durchaus vorstellbar, dass Störungen in nur einem Teil des Dreiklangles kapilläres Endothel, GBM oder Podozytenschlitzmembran mit sekundären Schäden in den anderen Anteilen einhergeht. Wie bereits erwähnt sind die Podozyten maßgeblich an der Integrität der glomerulären Basalmembran beteiligt (Oh et al. 2004, Durvasula und Shankland 2006).

Die Minderung der Konzentration des NCK2-Proteins bei dem Alporterkranken A4 könnte Ausdruck der Schädigung der glomerulären Schlitzmembran, der Podozyten und des gesamten Filtrationsapparates bei diesem Alporterkranken sein. Ein renaler Verlust

aus den geschädigten Podozyten ist plausibel. Die Schädigung findet bei dem Patienten ihren Ausdruck in der Mikrohämaturie und in der deutlichen Proteinurie von 460 mg/mmol Creatinin, die bereits durch den Einsatz eines ACE-Inhibitors gemindert wurde. Abgesehen von diesem Patienten fand sich kein weiterer Patient, der eine Verminderung des Proteins in den normierten Höhendsummen zeigt. Gerade die Patienten A1-A2-A3 erscheinen von den klinischen und paraklinischen Parametern vergleichbar. Damit wird der Wert dieses potentiellen Markers gemindert. Seine unmittelbare Verbindung zum Filtrationsapparat zieht jedoch die Notwendigkeit nach sich, ihn weiter zu evaluieren. Die Frage, ob ein unspezifischer NCK2-Verlust im Rahmen der Proteinurie stattfindet oder ob NCK2-Minderung für das AS spezifisch ist, ist mit weiteren Testreihen noch zu klären.

ADAM 8 (A disintegrin and metalloproteinase domain 8): P78325

Das Protein wird auf der Oberfläche von Neutrophilen und Monozyten exprimiert. Es ist ein Membranprotein mit Aufgaben bei der Extravasation von Leukozyten. Außerdem soll es extrazelluläre Matrixproteine degradieren und eine Rolle bei der Zellfusion spielen (Wolfsberg et al. 1995). Es ist wahrscheinlich, dass es in der Inflammation eine Rolle spielt. Weiterhin lässt sich eine vermehrte Expression der ADAM 8 in renalem Gewebe am murinen Modell der renalen Ischämie nachweisen (Kieran et al. 2003). Das kann als Hinweis für die Rolle der ADAM 8 im Rahmen eines (akuten) Nierenversagens gesehen werden.

Zeisberg et al. (Zeisberg et al. 2006) beschreiben in ihrer Arbeit den Einfluss der Matrixmetalloproteinasen (MMP) 2, 3 und 9 auf das AS. Sie verwendeten das Tiermodell der Kollagen alpha3(IV) -/- Maus. Zusätzlich konnten die Tiere entweder MMP 2 und/oder 9 nicht exprimieren. Fehlte jeweils eine oder beide dieser MMPs, stiegen kompensatorisch die anderen MMPs an. Weiterhin wiesen Sie nach, dass durch MMP 2, 3 und 9 die GBM des murinen AS verstärkt abgebaut wird. Ihnen gelang auch pharmakologisch die Ablation der MMPs, was je nach Einsatz vor Beginn der Proteinurie oder danach zu einem unterschiedlichen Ergebnis führte. Führte man die pharmakologische Ablation früh durch, konnte man das Überleben der betroffenen Tiere deutlich verlängern. Geschah dies nach Einsetzen der Proteinurie, überlebten die Tiere

signifikant kürzer und interstitielle Fibrosevorgänge im Nierenparenchym stellten sich verstärkt ein. Ein weiterer Hinweis für den Einfluss von MMPs in der Pathogenese des AS findet sich bei Rao et al. (Rao et al. 2006). Abladierte man medikamentös im Glomerulus des Tiermodells des AS die dort stark erhöhte MMP 12, so wurde die Ultrastruktur der GBM weitgehend wiederhergestellt. Ein Anstieg der MMP 12 im Glomerulus ließ sich bei alporterkrankten Hunden und Menschen nachweisen.

Daher könnte die hier nachgewiesene Erhöhung der ADAM 8 im Serum durchaus in Zusammenhang mit den Resultaten von Zeisberg et al. und Rao et al. gesehen werden. Möglicherweise spielt die ADAM 8 bei fibrotischen renalen Umbauvorgängen eine Rolle. Die Erhöhung der ADAM 8 fand sich bei dem Probanden A2, der einen deutlichen glomerulären und auch tubulären Schaden zeigte, der seinen Ausdruck in der glomerulären und tubulären Proteinurie und den sonographisch bestehenden Parenchymveränderungen fand. Die erhöhte ADAM 8 im Serum scheint wegen des höheren Anteils des Interstitiums am Nierengewebe im Vergleich zum glomerulären Apparat eher dem Interstitium zu entstammen. Denkbar ist jedoch auch eine erhöhte ADAM 8 im Serum durch eine gestörte Barrierefunktion im glomerulären oder tubulären Apparat. Dadurch könnte dieses Protein in den Blutkreislauf übertreten und vermehrt im Serum nachgewiesen werden.

5.6.3 Potentielle Matrix-Umbau-Marker

Fibronectin: P02751

Bei Alportpatient A4 ließ sich ein Anstieg des Fibronectins nachweisen. Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix. Es bindet an Zelloberflächen und bildet Verbindungen mit Kollagen, Fibrin, Heparin und Aktin aus. Weiterhin ist Fibronectin in die Zelladhäsion, die Zellmobilität, die Opsonierung, die Wundheilung und die Aufrechterhaltung der Zellform eingebunden (SwissProt-Datenbank).

Auf der einen Seite ist vorstellbar, dass das Fibronectin aufgrund der im fortschreitenden Krankheitsverlauf in Gang kommenden Fibroseprozesse anstieg. Es erscheint zumindest möglich, dass Serumveränderungen durch Fibroseprozesse im Bereich der Nieren, die sehr gut durchblutet sind, sich auch im Serum nachweisen lassen. Patient A4 zeigte neben

der schon beschriebenen Protein- und Erythrocyturie bereits sonographisch eine erhöhte Echogenität der Nieren, was Ausdruck fibrotischer Umbauprozesse sein könnte. Miner und Sanes gelang es (Miner und Sanes 1996), vermehrt Fibronectin in der GBM des Mausmodells Kollagen alpha3(IV) -/- nachzuweisen. Es erscheint jedoch mehr als fraglich, ob die zu erwartenden Mengen von Fibronectin im Serum aus der alterierten glomerulären Basalmembran ausreichend sein könnten, um einen nachweislichen Anstieg des Fibronectins zu verursachen. Die Erhöhung des Fibronectins erscheint eher mit den renalen Fibroseprozessen erklärlich. Eine erhöhte Ablagerung von Fibronectin in Glomerulus und Interstitium wurde bereits als Nachweis für verstärkte Fibrose im Mausmodell des AS genutzt (Koepke et al. 2007).

5.6.4 Potentielle Apoptose-Marker

Protein AATF (Apoptosis antagonizing transcription factor): Q9NY61

Protein AATF ist ein Protein, das antiapoptotische Wirkungen entfaltet. Es wird in verschiedenen Organen exprimiert, zu denen auch die Niere gehört. Es kommt in den Zellen des proximalen Tubulus vor. In Modellen des akuten Nierenversagens durch Ischämie und Reperfusion zeigt dieser Faktor seine Wirkung: unterdrückte man seine Funktion, so kam es zu vermehrter mitochondrialer Dysfunktion, zur Akkumulation von Superoxid und Peroxinitrit, Lipidperoxidation, Caspase-3-Aktivierung und im Weiteren zu apoptotischen Zelltod. Führt man experimentell die Zellen zu einer vermehrten Expression des AATF, fand man signifikant weniger Zeichen für apoptotischen Zelltod (Xie und Guo 2006). Die Autoren ordnen dieses Protein als potentiell Target für die medikamentöse Behandlung des akuten Nierenversagens ein.

Hier wurde Protein AATF nur im Paar A4-C2 mit einer Erhöhung der normierten Höhendsummen beim Alporterkrankten gefunden. Wie bereits erwähnt fanden sich bei Alportpatient A4 bereits eine deutliche Proteinurie und sonographisch veränderte Nieren. Somit ist durchaus von einem Zellschaden auszugehen. Bestätigt wird dieser Umstand durch den vermehrten tubulären Proteinverlust in der Urinproteinanalyse. Es ist plausibel anzunehmen, dass auch im chronischen Nierenversagen vermehrte Apoptose (Zeisberg et al. 2001) eine Rolle spielt.

5.6.5 Weitere potentielle Marker

Die im Folgenden beschriebenen Markerkandidaten, die die Suchkriterien erfüllen, sind nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand keinem bisher diskutierten Funktionskreis zuzuordnen.

Megalin: P98164

Megalin (Low-density lipoproteinreceptor related protein) ist 600 kDa großes Transmembranprotein. Es gehört zur LDL-Rezeptor-Familie. Es wird im Bereich der Oberfläche proximaler Tubuluszellen und im Glomerulus exprimiert (Moestrup und Verroust 2001). Megalin ist in diversen weiteren Geweben u. a. Thymus, Lunge oder Ileum nachgewiesen.

Es wirkt an der Endozytose der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) mit. Damit wird die MMP 9 der Degradierung zugeführt und letztlich unwirksam gemacht. Megalin scheint ein Antagonist der MMP9 zu sein (Van den Steen et al. 2006). Die stadienabhängige Rolle der MMP 9 (siehe 5.6.2) wurde in der Pathogenese des AS bereits beschrieben.

Eine weitere Aufgabe des Megalin ist die Endozytose von advanced glycation end products (AGE), die in der Niereninsuffizienz vermehrt anfallen (Saito et al. 2005). Seine Lokalisation im Bereich des Glomerulus und des Tubulus lässt Megalin als potentiellen Markerkandidaten erscheinen. Bei glomerulären oder tubulären Umbauvorgängen mit Fibrose könnte ein Abnehmen des Megalins, was in den Paaren A4-C2 und A5-C3 tatsächlich gemessen wurde, möglich sein. Eine renale Filtration erscheint aufgrund der Größe des Proteins unwahrscheinlich. Auch in der Untersuchungsreihe A1-A2-A3 konnte eine Abnahme im Vergleich zum Gesunden gemessen werden. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch bestehenden methodischen Mängel kann diese Information keinen Eingang in die Diskussion finden.

Komplizierend ist jedoch, dass sich Megalin, wie erwähnt, in diversen anderen Geweben nachweisen lässt. Deswegen dürfte es schwer sein, die definitive Herkunft aus der Niere nachzuweisen.

Protein–Arginin–N–Methyltransferase 3: O60678

Protein–Arginin–N–Methyltransferasen, auch PRMT, methylieren Arginin an bestimmten Proteinen. Bei PRMTs lassen sich zwei Gruppen unterscheiden:

- Typ 1: nonmyelin–basic–protein–spezifische Aktivität, katalysiert die Bildung von N^G–monomethyl–Arginin und asymmetrischen Dimethylarginin, damit hauptsächliches Enzym für die Bildung von asymmetrischem Dimethylarginin.
- Typ 2: myelin–basic–protein spezifisch als Substrat, katalysiert die Bildung von N^G–monomethyl–Arginin und symmetrischem Dimethylarginin.

Protein–Arginin–N–Methyltransferase 3 gehört zum Typ 1 und findet sich im menschlichen Organismus in diversen Organen, zu denen auch die Niere gehört.

Protein–Arginin–N–Methyltransferase 3 ist vorwiegend zytosolisch zu finden. Substrate sind im Falle dieses Proteins der heterogenous nuclear ribonuclear protein complex A1 und A2 und das poly(A)-binding protein. Hierbei entsteht asymmetrisch dimethyliertes Arginin (ADMA), das die Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) hemmt. Auch das N^G–monomethyl–Arginin hemmt die NOS, das symmetrische Dimethylarginin hat diese Fähigkeit nicht (Anthony et al. 2005). ADMA wird aus der Zelle ausgeschleust und ist in Plasma und Urin nachzuweisen (Maas 2005) (Abbildung 7). Erhöhte ADMA–Werte lassen sich beispielsweise bei folgenden pathologischen Zuständen nachweisen: Nierenversagen, kindlicher Hypertonus, Schwangerschaftshypertonus, Preeklampsie, pulmonale Hypertension, Atherosklerose, Hypercholisterinämie, thrombotische Mikroangiopathie, Insult und weitere (Anthony et al. 2005).

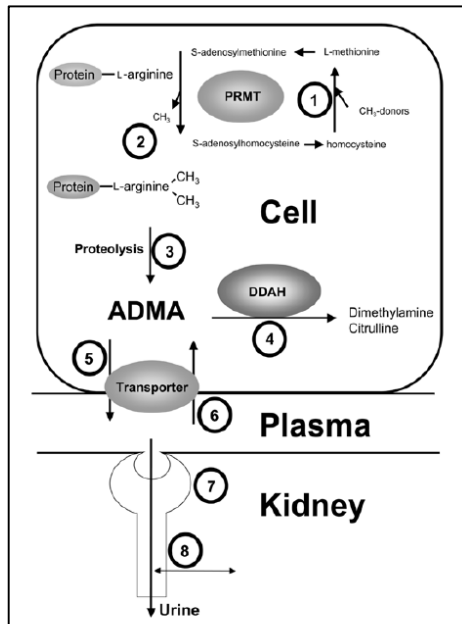


Abbildung 7: Bildung und Elimination der ADMA

- (1) S-Adenosylmethionin als Quelle von Methylgruppen
- (2) Asymmetrische Methylierung der L-Arginin-Residuen in Proteinen durch Typ I Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT)
- (3) Proteolyse führt zur Freisetzung von ADMA
- (4) Degradierung von ADMA durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)
- (5) Transportervermittelte Ausscheidung von ADMA aus der Zelle
- (6) Transportervermittelte Aufnahme von ADMA in die Zelle
- (7) Renale Filtration von ADMA
- (8) Transportervermittelte Ausscheidung und Wiederaufnahme von ADMA.

Zieht man nun den Vergleich zwischen den Alportseren A1-A2-A3 und C1 heran, so gelang der Nachweis des Anstieges der normierten Höhendsummen von Protein-Arginin-N-Methyltransferase 3 nur bei dem Patienten A2. Nach den bereits beschriebenen Kriterien stellt dieses Protein einen Markerkandidaten dar. Unter Umständen lässt sich das Protein in das Erkrankungsgeschehen einordnen. Die erhöhten ADMA-Spiegel, die man in den erwähnten pathologischen Zuständen misst, müssen jedoch nicht ihre Ursachen in der vermehrten Bildung durch erhöhte PRMT haben. Vielmehr ist es plausibler, einen verminderten Abbau durch Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase anzunehmen (Zoccali 2006).

P2X Purinozeptor 7: Q99572

P2-Rezeptoren werden unterschieden in metabotrope P2Y- und ionotrope P2X-Rezeptoren. Sie werden spezifisch aktiviert von extrazellulären Nukleotiden wie ATP, ADP, UTP und UDP und in vielen Geweben vor allem an luminalen Epithelien exprimiert und zeigen vielfältige biologische Effekte. Folgende Aufgaben werden vorgeschlagen (SwissProt-Datenbank):

- Aufgaben in der sekretorischen Abwehr bei luminalen P2 Rezeptoren

- Regulation von Zellvolumina, wenn der transzelluläre Flüssigkeitstransport gestört ist
- Vermittlung von Zellprotektion und Regeneration bei Ischämie
- Vermittlung von Wachstum der Zysten bei polyzystischer Nierenerkrankung

Der nachgewiesene Abfall des P2X Purinozeptor 7 im Serum von A5 lässt sich bisher nicht in Zusammenhang mit der Pathogenese des AS bringen. Sein Wert als Markerkandidat ist auch wegen des isolierten Auftretens in nur einem Paar sehr fraglich.

Apolipoprotein A-I: P02647

Apolipoproteine spielen eine wichtige Rolle im Lipidtransport und -stoffwechsel.

In allen Paaren zeigte sich ein im Vergleich Gesund/Krank ein verändertes Verteilungsverhalten über mehrere Fraktion. Ein eindeutiger Abfall oder Anstieg der normierten Höhensummen bei allen Patienten oder Probanden war nicht festzustellen. Im Weiteren fanden sich im Verteilungsverhalten keine Ähnlichkeiten innerhalb der Gruppe der Alportpatienten. Apolipoprotein A-I ist nur 27 kDa groß. Es ist jedoch überwiegend in große Komplexe eingebunden. Ein über alle infrage kommenden Fraktionen nachzuweisender Verlust bei den Alportpatienten bestand nicht. Insgesamt könnte der Befund Ausdruck variabler Fettstoffwechselstörung sein, die die renale Erkrankung begleitet. Eine Einordnung als potentieller Marker erscheint nicht möglich.

Pregnancy zone protein: P20742

Dieses Protein gehört zu der Familie Protease-Inhibitor I39, zu der auch alpha-2-Makroglobulin gehört. Die Proteasen werden nach den gleichen Mechanismen inhibiert (SwissProt-Datenbank).

Der Anstieg war in den Proben A4-C2 und A5-C3 beim Alportpatienten deutlich nachzuweisen. Insgesamt ist aus der Literatur bisher kein Zusammenhang zum AS oder anderen renalen Erkrankungen bekannt.

Pregnancy zone protein und alpha-2-Makroglobulin zeigen in Struktur und Funktion Ähnlichkeiten (SwissProt-Datenbank). Der Anstieg beider Antiproteasen könnte durch den gleichen unbekannten Auslöser hervorgerufen sein.

6. Schlussfolgerung

Mit der proteomicsbasierten Methode konnten plausible und bekannte Veränderungen wie das Absinken des Albumins im Serum in der proteinurischen Phase des AS nachvollzogen werden. Auch eine Verminderung des IgG bei den Alporterkranken in der proteomicsbasierten Analyse wurde durch den Verlust von IgG im Urin in der Routineanalyse gestützt. Der Nachweis dieser bekannten Veränderungen lässt auf die Validität der Methode schließen und stützt somit den Nachweis bisher nicht bekannter Serumveränderungen des AS.

Mit dieser Versuchsreihe gelang es, diverse potentielle Markerkandidaten zu isolieren. Einen Teil davon konnte theoretisch in das Erkrankungsgeschehen des AS eingeordnet werden. Viel versprechend erscheinen beispielsweise das Myosin 9, gerade in Zusammenhang mit dem Myosin 14, weiterhin das Kollagen alpha2(IV), die ADAM 8 und das Protein NCK-2.

Es bleibt jedoch zu betonen, dass sich kein einziges Protein oder Peptid über alle Patienten hinweg mit einem Abfall oder mit einem Anstieg der normierten Höhendsummen und Founds nachweisen ließ.

Hierfür lassen sich verschieden Gründe anführen:

1. Physiologisch bestehende interindividuelle Unterschiede.
2. Die Patienten befanden sich in verschiedenen Erkrankungsstadien.
3. Einflussfaktoren, die nicht in Zusammenhang mit dem AS stehen, verändern einen potentiellen Kandidaten beim Gesunden oder auch beim Alportpatienten, so dass eine Differenz zwischen beiden nicht mehr zu messen ist.
4. Die relativ kleine Stichprobe bildet selbst bei potentiell hoher Genauigkeit der Methode die wirkliche Verteilung der potentiellen Markern in der Alportpopulation nicht adäquat ab.
5. Der hochkomplexe Analysevorgang birgt die Gefahr von Fehlern, die das Ergebnis verfälschen.
6. Absonderungen der potentiellen Markerkandidaten in das Serum aus anderem Ursprung, z. B. bei verschiedenen Syntheseorten, können das Ergebnis verfälschen.

Dementsprechend müssten die gefundenen potentiellen Marker noch weiter verifiziert werden:

1. Eine unabhängige zweite Methode muss im Anschluss an diese Analyse die Ergebnisse in unfraktionierten Seren bestätigen oder anfechten.
2. Diese zweite Methode muss an einer deutlich größeren Population angewendet werden.
3. Die Spezifität der potentiellen Markerkandidaten muss für das AS geprüft werden, indem die Kandidaten bei anderen Erkrankungen überprüft werden.

Es bleibt zu vermuten, dass nicht ein Marker allein für die Diagnose des AS in Betracht kommt, sondern dass am ehesten eine Kombination mehrerer Proteine die Diagnose ermöglichen könnte oder aber auch den Krankheitsfortschritt dokumentiert.

Betrachtet man den sehr aufwendigen Analysevorgang, so erscheint die Methode zur Vorauswahl neuer und potentieller Marker an geringen Fallzahlen geeignet.

7. Literaturverzeichnis

- Adler L**, Mathew R, Futterweit S, Frank R, Gauthier BG, Kashtan CE, Trachtman H. 2002. Angiotensin converting enzyme inhibitor therapy in children with Alport syndrome: effect on urinary albumin, TGF-beta, and nitrite excretion. *BMC Nephrol*, 3:2
- Alport AC**. 1927. Hereditary familial congenital hemorrhagic nephritis. *Br Med J*, 1:504–506.
- Anthony S**, Leiper J, Vallance P. 2005. Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med*, 10 Suppl 1:S3-S9.
- Arrondel C**, Vodovar N, Knebelmann B, Grünfeld JP, Gubler MC, Antignac C, Heidet L. 2002. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephrol*, 13(1):65-74.
- Bakker WW**, Borghuis T, Harmsen MC, van den Berg A, Kema IP, Niezen KE, Kapojos JJ. 2005. Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney Int*, 68(2):603-610.
- Bakker WW**, van Dael CM, Pierik LJ, van Wijk JA, Nauta J, Borghuis T, Kapojos JJ. 2005. Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse. *Pediatr Nephrol*, 20(10):1410-1415.
- Borth W**. 1992. Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J*, 6(15):3345-3353.
- Bost F**, Diarra-Mehrpour M, Martin JP. 1998. Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family-a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem*, 252(3):339-346.
- Bublitz R**, Kreusch S, Ditze G, Schulze M, Cumme GA, Fischer C, Winter A, Hoppe H, Rhode H. 2006. Robust protein quantitation in chromatographic fractions using MALDI-MS of tryptic peptides. *Proteomics*, 6(13):3909-3917.
- Callis L**, Vila A, Carrera M, Nieto J. 1999. Long-term effects of cyclosporine A in Alport's syndrome. *Kidney Int*, 55(3):1051-1056.
- Callis L**, Vila A, Nieto J, Fortuny G. 1992. Effect of cyclosporine A on proteinuria in patients with Alport's syndrome. *Pediatr Nephrol*, 6(2):140-144.

- Charbit M**, Gubler MC, Dechaux M, Gagnadoux MF, Grünfeld JP, Niaudet P. 2007. Cyclosporine therapy in patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 22(1):57-63.
- Chen D**, Jefferson B, Harvey SJ, Zheng K, Gartley CJ, Jacobs RM, Thorner PS. 2003. Cyclosporine A slows the progressive renal disease of Alport Syndrome (x-linked hereditary nephritis): results from a canine model. *J Am Soc Nephrol*, 14(3):690-698.
- Cohen EP**, Lemann J. 1996. In hereditary nephritis angiotensin-converting enzyme inhibition decrease proteinuria and may slow rate of progression. *Am J Kid Dis*, 27(2):199-203.
- Daemen MA**, Heemskerk VH, van't Veer C, Denecker G, Wolfs TG, Vandenabeele P, Buurman WA. 2000. Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation*, 102(12):1420-1426.
- Donaudy F**, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C, Ficarella R, Declau F, Pusch CM, Nürnberg P, Melchionda S, Zelante L, Ballana E, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Savoia A. 2004. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74(4):770-776.
- Durvasula RV**, Shankland SJ. 2006. Podocyte injury and targeting therapy: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 15(1):1-7.
- Epstein FH**. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *NEJM*, 340(6):448-454.
- Flinter FA**, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. 1988. Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet*, 2(8618):1005-1007.
- Floege J**, Kunter U, Weber M, Gross O. 2006. Bone marrow transplantation rescues Alport mice. *Nephrol Dial Transpl*, 21(10):2721-2723.
- Ganz T**. 2006. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. *Pediatr Blood Cancer*, 46(5):554-557.
- Golomb E**, Ma X, Jana SS, Preston YA, Kawamoto S, Shoham NG, Goldin E, Conti MA, Sellers JR, Adelstein RS. 2004. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*, 279(4):2800-2808.

- Grodecki KM**, Gains MJ, Baumal R, Osmond DH, Cotter B, Valli VEO Jacobs RM. 1997. Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme inhibitor. *J Comp Pathol*, 117(3):209-225.
- Gross O**, Beirowski B, Koepke ML, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze-Lohoff E, Weber M. 2003. Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney Int*, 63(2):764-766.
- Gross O**, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. 2002. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counseling. *Nephrol Dial Transplant*, 17(7):1218-1227.
- Gross O**, Weber M. 2005. Von der Molekulargenetik des Alport-Syndroms zu Prinzipien der Organprotektion bei chronischen Nierenerkrankungen. *Med Klin*, 100(12):826-831.
- Gubler MC**, Knebelmann B, Antignac C. 1999. Inherited glomerular disease. In: Barratt TM, Avner ED, Harmon WE, Editors. *Pediatric nephrology*. 4th edition. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 475-495.
- Haubitz M**, Fliser D, Haller H. 2004. Proteomanalyse—eine neue Perspektive für die klinische Diagnostik. *Deutsches Ärzteblatt*, 101(21):A1515-1517.
- Horn A**, Kreusch S, Bublitx R, Hoppe H, Cumme GA, Schulze M, Moore T, Ditze G, Rhode H. 2006. Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology. *Proteomics*, 6(2):559-570.
- Housley J**. 1968. Alpha-2-macroglobulin levels in disease in man. *J Clin Pathol*, 21(1):27-31.
- Immenschuh S**, Nagae Y, Satoh H, Baumann H, Muller-Eberhard U. 1994. The rat and human hemopexin genes contain an identical interleukin-6 response element that is not a target of CAAT enhancer-binding protein isoforms. *Biol Chem*, 269(17):12654-12661.
- Immenschuh S**, Song DX, Satoh H, Muller-Eberhard U. 1995. The type II hemopexin interleukin-6 response element predominates the transcriptional regulation of the hemopexin acute phase responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*, 207(1):202-208.
- Jais JP**, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K,

Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. 2000. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *Am Soc Nephrol*, 11(4):649-657.

Joven J, Cliville X, Camps J, Espinel E, Simo J, Vilella E, Oliver A. 1997. Plasma protein abnormalities in nephrotic syndrome: effect on plasma colloid osmotic pressure and viscosity. *Clin Chem*, 43(7):1223-1231.

Kaito H, Nozu K, Iijima K, Nakanishi K, Yoshiya K, Kanda K, Przybyslaw Krol R, Yoshikawa N, Matsuo M. 2006. The effect of aldosterone blockade in patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 21(12):1824-1829.

Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG. 1997. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest*, 99(10):2470-2478.

Kashtan CE. 1998. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol*, 9(9):1736-1750.

Kashtan CE. 1999. Alport Syndrome: an inherited disorder of renal, ocular and cochlear basement membranes. *Medicine*, 78(5):338-360.

Kashtan CE. 2004. Familial hematuria due to type IV collagen mutations: Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Curr Opin Pediatrics*, 16(2):177-181.

Kashtan CE. 2005. Familial hematurias: what we know and what we don't. *Pediatr Nephrol*, 20(8):1027-1035.

Kashtan CE. 2006. Renal transplantation in patients with Alport syndrome. *Pediatr Transplantation*, 10(6):651-657.

Kawamoto S, Adelstein RS. 1991. Chicken nonmuscle myosin heavy chains: differential expression of two mRNAs and evidence for two different polypeptides. *Cell Biol*, 112(5):915-924.

Kaysen GA. 1998. Biological basis of hypoalbuminemia in ESRD. *J Am Soc Nephrol*, 9(12):2368-2376.

- Kemper MJ**, Bello AB, Altrogge H, Timmermann K, Ludwig K, Müller-Wiefel DE. 1999. Iron homeostasis in relapsing steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood. *Clin Nephrol*, 52(1):25-29.
- Kieran NE**, Doran PP, Connolly SB, Greenan MC, Higgins DF, Leonard M, Godson C, Taylor CT, Henger A, Kretzler M, Burne MJ, Rabb H, Brady HR. 2003. Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int*, 64(2):480-492.
- Koepke ML**, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O. 2007. Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 22(4):1062-1069.
- Kreusch S**, Hoppe H, Bublitz R, Moore T, Schulze M, Hallbauer J, Cumme G, Misselwitz J, Klemm A, Osterloh D, Russwurm S, Rhode H. 2005. Non-denaturing multidimensional separation of serum proteomes; improved method, automatization and applications [Poster]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Lalwani AK**, Goldstein JA, Kelley MJ, Luxford W, Castelein CM, Mhatre AN. 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am J Hum Genet*, 67(5):1121-1128.
- Lisowska-Myjak B**. 2005. AAT as a diagnostic tool. *Clin Chim Acta*, 352(1-2):1-13.
- Lu HZ**, Yuan YS, Zhang WM, Liu D, Kuang HY. 2006. Concentrations of serum iron and transferrin in children with nephrotic syndrome. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 8(6):467-469.
- Maas R**. 2005. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc Med*, 10 Suppl 1:S49-S57.
- Marigo V**, Nigro A, Pecci A, Montanaro D, Di Stazio M, Balduini CL, Savoia A. 2004. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics*, 83(6):1125-1133.
- Meier U**, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. 2006. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem*, 52(7):1247-1253.
- Miner JH**, Sanes JR. 1996. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol*, 135(5):1403-1413.

- Moestrup SK**, Verroust PJ. 2001. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr*, 21:407-428.
- Moriyama MT**, Glenton PA, Khan SR. 2001. Expression of inter-alpha inhibitor related proteins in kidneys and urine of hyperoxaluric rats. *J Urol*, 165(5):1687-1692.
- Moshage H**. 1997. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol*, 181(3):257-266.
- Muda AO**, Massella L, Giannakakis K, Renieri A, Rizzoni G, Faraggiana T. 2003. Confocal microscopy of the skin in the diagnosis of x-linked Alport syndrome. *J Invest Dermatol*, 121(1):208-211.
- Naito I**, Nomura S, Inoue S, Kagawa M, Kawai S, Gunshin Y, Joh K, Tsukidate C, Sado Y, Osawa G. 1997. Normal distribution of collagen IV in renal basement membranes in Epstein's syndrome. *J Clin Pathol*, 50(11):919-922.
- Nangaku M**, Pippin J, Couser WG. 2002. C6 mediates chronic progression of tubulointerstitial damage in rats with remnant kidneys. *Am Soc Nephrol*, 13(4):928-936.
- Nangaku M**. 2004. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med*, 43(1):9-17.
- Oh J**, Reiser J, Mundel P. 2004. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 19(2):130-137.
- Pajari H**, Koskomies O, Muhonen T, Kääärinen H. 1996. Alport's syndrome in 78 patients: epidemiology and clinical study. *Acta Paediatr*, 85(11):1300-1306.
- Prodromidi EI**, Poulson R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, Cook HT. 2006. Bone-marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells*, 24(11):2448-2455.
- Proesmans W**, Knoeckert H, Trouet D. 2000. Enalapril in paediatric patients with Alport syndrome: 2 years' experience. *Eur J Pediatr*, 159(6):430-433.
- Proesmans W**, Van Dyck M. 2005. Enalapril in children with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 19(3):271-275.
- Rao VH**, Meehan DT, Delimont D, Nakajima M, Wada T, Gratton MA, Cosgrove D. 2006. Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with Alport syndrome. *Am J Pathol*, 169(1):32-46.

- Romão JE**, Haiashi AR, Elias RM, Luders C, Ferraboli R, Castro MC, Abensur H. 2006. Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*, 26(1):59-66.
- Saito A**, Takeda T, Sato K, Hama H, Tanuma A, Kaseda R, Suzuki Y, Gejyo F. 2005. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1043:637–643.
- Schärer K**. 2002. Hereditäre Nephropathien. In: Schärer K, Mehls O, Hrsg. Pädiatrische Nephrologie. Erste Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer-Verlag, 109-117.
- Schwartz GJ**, Furth SL. 2007. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 22(11):1839-1848.
- Schwartz GJ**, Haycock GB, Edelmann CM, Spitzer A. 1976. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*, 58(2):259-263.
- Sellers JR**. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochem Biophys Acta*, 1496(1):3-22.
- Seri M**, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E, Nigro A, Noris P, Gangarossa S, Rocca B, Gresele P, Bizzaro N, Malatesta P, Koivisto PA, Longo I, Musso R, Pecoraro C, Iolascon A, Magrini U, Rodriguez Soriano J, Renieri A, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Balduini CL, Savoia A. 2003. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine*, 82(3):203-215.
- Sugimoto H**, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. 2006. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(19):7321-7326.
- SwissProt-Datenbank**, www.expasy.org, Stand 10/2007
- Tada T**, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T. 1991. Immunohistochemical localization of Zn-alpha2-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 39(9):1221-1226.
- Thomas L**, Hrsg. 2000. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden. Fünfte Aufl. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft.

- Thomas S**, Wolf SE, Murphy KD, Chinkes DL, Herndon DN. 2004. The long-term effect of oxandrolone on hepatic acute phase proteins in severely burned children. *J Trauma*, 56(1):37-44.
- Toothaker LE**, Gonzalez DA, Tung N, Lemons RS, Le Beau MM, Arnaout MA, Clayton LK, Tenen DG. 1991. Cellular myosin heavy chain in human leukocytes: isolation of 5' cDNA clones, characterization of the protein, chromosomal localization, and upregulation during myeloid differentiation. *Blood*, 78(7):1826-1833.
- Tryggvason K**, Patrakka J, Wartiovaara J. 2006. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354(13):1387-1401.
- Tryggvason K**, Pikkarainen T, Patrakka J. 2006. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell*, 125(2):221-224.
- Van den Steen PE**, Van Aelst I, Hvidberg V, Piccard H, Fiten P, Jacobsen C, Moestrup SK, Fry S, Royle L, Wormald MR, Wallis R, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. 2006. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem*, 281(27):18626-18637.
- Vaziri ND**. 2001. Erythropoietin and Transferrin Metabolism in Nephrotic Syndrome. *Am J Kidney Dis*, 38(1):1-8.
- Vaziri ND**, Gonzales EC, Shayestehfar B, Barton CH. 1994. Plasma levels and urinary excretion of fibrinolytic and protease inhibitory proteins in nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med*, 124(1):118-124.
- Witte J**, Jochum M, Scherer R, Schramm W, Hochstrasser K, Fritz H. 1982. Disturbances of selected plasma proteins in hyperdynamic septic shock. *Intensive Care Med*, 8(5):215-222.
- Wolfsberg TG**, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin and Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol*, 131(2):275-278.
- Xie J**, Guo Q. 2006. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*, 17(12):3336-3346.
- Yoshioka K**, Hino S, Takemura T, Maki S, Wieslander J, Takekoshi Y, Makino H, Kagawa M, Sado Y, Kashtan CE. 1994. Type IV collagen alpha 5 chain. Normal

distribution and abnormalities in X-linked Alport syndrome revealed by monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 144(5):986-996.

Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, Shield CF 3rd, Werb Z, Kalluri R. 2006. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med*, 3(4):e100.

Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. 2001. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10(3):315-320.

Zipfel PF, Heinen S, Jozsi M, Skerka C. 2006. Complement and diseases: Defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol*, 43(1-2):97-106.

Zipfel PF, Misselwitz J, Licht C, Skerka C. 2006. The role of defective complement control in hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*, 32(2):146-154.

Zoccali C. 2006. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a cardiovascular and renal risk factor on the move. *J Hypertens*, 24(4):611-619.

8. Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michael Pohl
geboren am 25.11.1972 in Berlin
Lebenspartnerin, zwei Kinder

Schulische Bildung

09/1989 - 07/1991 EOS „A. v. Humboldt“ Berlin, Abitur; Note: 1,2
09/1979 – 07/1989 POS „Paul Robeson“

Zivildienst

09/1991 - 10/1992 Krankenpflegehelfer im KKH Hedwigshöhe Berlin

Hochschulbildung

26.10.1999 III. Staatsexamen „sehr gut“, Gesamtnote 2,16
10/1992 - 11/1999 Medizinstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin

Forschung

seit 10/2004 Forschung im Rahmen der Promotion „Morbus Alport -
proteomicsbasierte Suche nach Biomarkern im Serum“
10/1996 – 04/1997 Forschungssemester: „Neuroprotektion bei Hirntrauma“

Berufspraxis

seit 11/2003 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der FSU Jena
10/2001 – 05/2003 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Johanniter-Klinikums Stendal
04/2000 – 09/2001 AiP an der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
des Johanniter-Klinikums Stendal

Weiteres

05/2003 –10/2003 Erziehungszeit für Sohn Julius
Hobbys: Politik, Musik, Film, Rudern, Fußball

Jena, im Oktober 2007

Michael Pohl

Danksagung

Neben denen, die mich in der Erstellung der Promotionsarbeit direkt unterstützt haben, gilt mein besonderer Dank den Patienten und Probanden und deren Eltern, weiterhin besonders Frau PD Dr. med. Rhode und Herrn Prof. Dr. med. Misselwitz und meiner eigenen Familie, ohne deren Mithilfe und Geduld ich nicht hätte arbeiten können.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. Rhode, Herr Prof. Dr. Misselwitz, Herr Dr. St. Kreusch, Frau B. Colditz, Frau H. Endmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 10.10.07

Michael Pohl